



TITLE:

Aspergillus terreusの代謝産物の構造と生合成に関する研究(
Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

荒井, 國三

CITATION:

荒井, 國三. Aspergillus terreusの代謝産物の構造と生合成に関する研究.
京都大学, 1984, 薬学博士

ISSUE DATE:

1984-09-25

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.r5371>

RIGHT:

新	制
榮	
116	

附図

Aspergillus terreus の代謝産物の構造と 生合成に関する研究

荒 井 國 三

目 次

緒 言	1
第 1 章 Asterriquinone 類について	5
第 1 節 <i>A. terreus</i> IFO 6346 株 および var. <i>africanus</i> IFO 8835 株 から asterriquinone 類の単離	5
第 2 節 Asterriquinone 類の構造	8
第 3 節 Asterriquinone 類の脱メチル化について	29
第 4 節 Asterriquinone 類の生合成について	36
第 2 章 Asterriquinol 誘導体その他の tryptophan 関連代謝産物	43
第 1 節 <i>A. terreus</i> var. <i>africanus</i> IFO 8835 株から単離した Asterriquinol 類縁代謝産物と tripeptide 様代謝産物に ついて	43
a) 代謝産物の単離	43
b) Asterriquinol 誘導体の構造	44
c) Tripeptide 様代謝産物の構造	49
第 2 節 <i>A. terreus</i> IFO 6123 株より単離された代謝産物 astechrome について	52
a) Astechrome の単離	52
b) Astechrome の構造について	53
第 3 章 <i>Aspergillus terreus</i> IFO 4100 株の代謝産物 astepyrone について	59
第 1 節 <i>A. terreus</i> IFO 4100 株の代謝産物の単離とその構造 について	59
a) <i>A. terreus</i> IFO 4100 株の代謝産物の単離	59
b) Astepyrone の構造	60

c) Astepyrone 類似の代謝産物の構造	63
d) その他の代謝産物の構造	64
第2節 Astepyrone の生合成について	65
結論と要約	69
謝 辞	73
実験の部	74
引用文献	121

緒 言

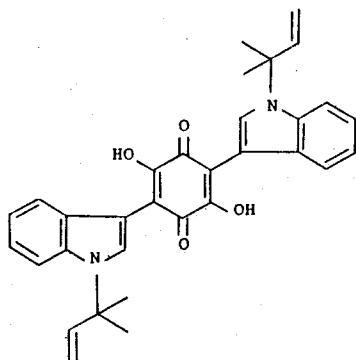
わが国は気候が温暖でしかも多湿であるのでかび（糸状菌）の発育に適しており、古来日本人はかびと深いかかわり合いを持ってきた。そのことは我々がかびの発酵を利用して清酒や醤油、味噌などの栄養価値の高い発酵製品を創造して食生活を豊かにしてきたことや、現在抗生物質の開発や生産などの分野において世界のトップレベルに位置していることの基盤となっている。かびはこのように食品、医薬品などに利用される有用な面とともに食品劣化の原因となったり、ヒトや家畜に有害な物質を生産するなど好ましくない側面を持っている。

著者の属する金沢大学薬学部生化学教室では、*Penicillium urticae* による牛の集団中毒、*Penicillium islandicum* による黄変米事件、*Aspergillus fumigatus* によるジャム中毒などの原因物質の追究や、*Oospora* 属の代謝産物と気管支喘息の関係の解明など、かびの代謝産物が人畜に及ぼす有害な作用の面を主として取り上げ、かびから単離した物質について化学構造や生合成、毒性の作用機序などの研究を行ってきた¹⁾

かびは種類が多く（約 100 万種以上）しかも培養条件が変わると、代謝産物の収量のみならず種類も多様に変化する。そのため実に多種類の代謝産物が生産され、しかも本論文で見るように植物由来の代謝産物とは異なる新規な構造の物質も多く存在する。

したがってその代謝産物中には当然薬として利用できるような物質がしばしば発見される。山本らは toluquinone 系化合物の生合成を検討中に *Aspergillus terreus* IFO 6123 株からかびとしては珍しい含窒素代謝産物で indolyl benzoquinone 骨格を持つ asterriquinone (1) を単離し、これが強い抗腫瘍活性を示すことを明らかにした²⁾

著者はこの研究をさらに発展させ、*Aspergillus terreus* IFO 6123 株から得られる 1 の収量を高めるための培養条件を検討すると共に、1 よりさらに有効な抗腫瘍活性を持つ asterriquinone 系化合物を得ようとして *Aspergillus terreus* 属の菌株で入手可能であった IFO 4100, 5445, 6346, 6365, 7078, 8835 (var. *afri-canus*), ATCC 12238 の代謝産物について検索を行った。この間、特に

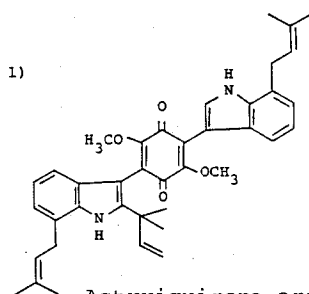


Asterriquinone (1)

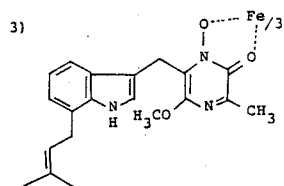
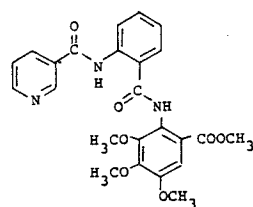
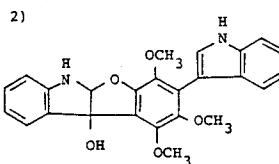
Aspergillus terreus IFO 4100 株および 6346, 8835 (var. *africanus*) 株からは多数の新代謝産物を単離し構造を明らかにした。

これらの物質は構造により (1) asterriquinone 類縁化合物 (13 種類) (2) asterriquinol その他の tryptophan 関連代謝産物 (9 種類) (3) astechrome (4) astepyrone に分類される。

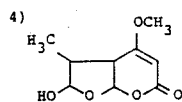
代表的な代謝産物の構造を次に示す。



Astrriquinone analogue
(AQ-A-2)



Astechrome



Astepyrone

これらの中には多くの新規な構造を持つ化合物が含まれているので生理活性についてもそれぞれ検討を行った。

次にこれら代謝産物の生合成について検討を行った。

かびの生産する二次代謝産物の生合成研究は①植物に比べて培養条件が調整し易い ②培養期間が概ね2～4週間と比較的短い ③比較的多量の代謝産物を生産する ④変異株を比較的可得い などの諸点において植物などの場合より有利である。

生合成研究の実験法を大別するとトレーサー実験法と酵素実験法に分類される。トレーサー実験法はさらに放射性同位元素法と安定同位元素法に分けられる。

かびから酵素を抽出精製することは、細胞がしばしば酵素蛋白質阻害物質を含むことや、堅い細胞壁が酵素の溶出を妨げることなどのため、細菌や動物組織の場合に比べて一般的に難しく、酵素の調製には工夫を要する。しかし生合成前駆体が不安定なときや膜透過性が悪いため *in vivo* で生合成経路が証明できない場合、酵素実験法は有効な手段となる。

Asterriquinone 系化合物の生合成研究には放射性同位元素によるトレーサー法を主として用い、indolepyruvic acid 2分子が1位と3'位の間、1'位と3位の間で縮合して形成されることを明らかにした。またインドール核のプレニル化機構については酵素実験法を用い検討した (Chart 1)。

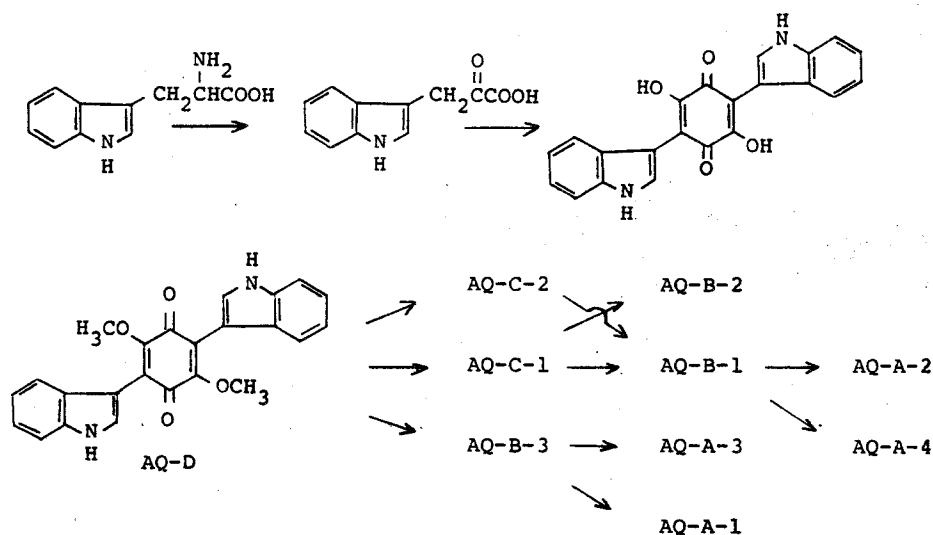


Chart 1

次に astepyrone の生合成については ^{13}C 安定同位元素法を用い、本化合物がポリケタイド由来の代謝産物、orsellinic acid の 4 位と 5 位の間の酸化的環開裂により生合成されることを明らかにした (Chart 2)。

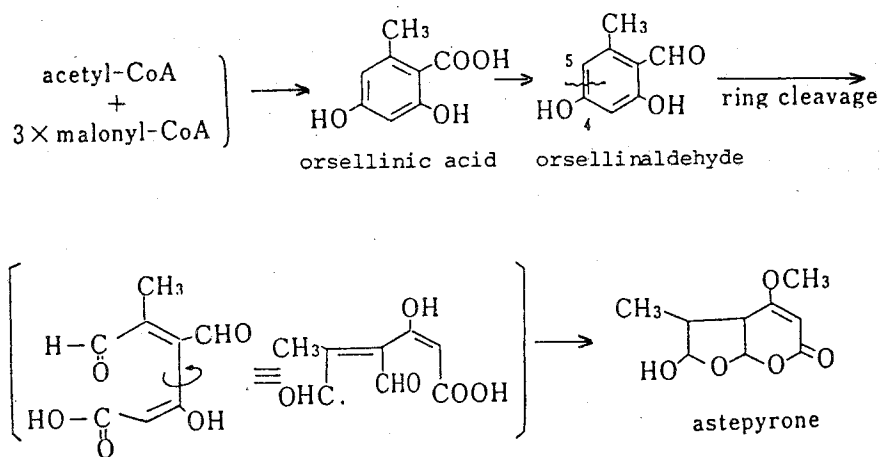


Chart 2

第1章 Asterriquinone 類について

緒言で述べたように *Aspergillus terreus*^{*)} IFO 6123 株より単離された asterriquinone (1) は強い抗腫瘍活性を示したが、本化合物の生成量は低く (9 mg/l) 各種活性試験に供給する量を確保するには大変な労力を必要とした。そこで我々は 1 の収量を高めるため種々培養条件について検討すると共に、1 の近縁構造を持った代謝産物にも抗腫瘍活性があることを期待して 1 およびその類似物質を生産する菌株を *A. terreus* の中に求めた。検討した多くの菌株のうち、*A. terreus* IFO 6346 株が 2 種、*A. terreus* var. *africanus* IFO 8835 株が 11 種の asterriquinone 類縁代謝産物を生産することがわかった。

以下、第 1 節ではこれら物質の単離方法、第 2 節では化学構造、第 3 節では脱メチル化の反応、さらに第 4 節では生合成について述べる。

第 1 節 *A. terreus* IFO 6346 株および var. *africanus* IFO 8835 株から asterriquinone 類の単離

1) *A. terreus* var. *africanus* IFO 8835 株の紫色色素の単離

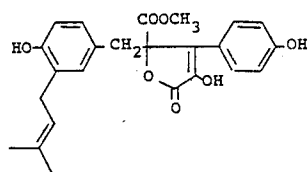
A. terreus var. *africanus* IFO 8835 株を麦芽エキス培地 (グルコース, 20 g; 麦芽エキス, 20 g; ポリペプトン, 5 g^{**)}) に植菌し 27°C で 2 週間静置培養する。培養後菌体と培養液を分ち、菌体を風乾後石油エーテル, エーテルの順にソックスレー装置で抽出した。

石油エーテル抽出部を濃縮後、MeOH 抽出し脂質部分を除いた。MeOH 抽出部は濃縮し、析出する ergosterol を戸別し母液を減圧留去して石油エーテル部色素群を得た (収量, 300 mg/l)。

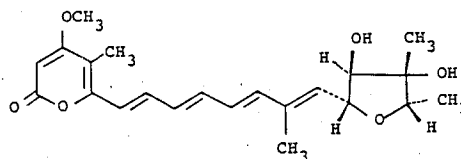
*) 以下 *Aspergillus terreus* を *A. terreus* と略称する。

**) 培地に添加するポリペプトン量は通常は 1 g であるがここでは asterriquinone 類の収量が最高値を示す 5 g を用いた。

エーテル抽出部を 10% Na_2CO_3 で抽出して Na_2CO_3 可溶部を除き（この分画から butyrolactone 誘導体（2）が単離された³⁾（収量, 500mg/l）），エーテル層を一夜放置したところ黄色色素, citreoviridin⁴⁾（3）（収量, 300mg/l；衝心脚気の原因物質と考えられている mycotoxin）が析出した。これを分別し母液を減

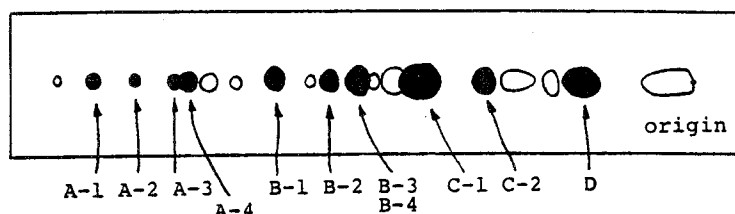


Butyrolactone-I (2)



Citreoviridin (3)

圧乾固したところ殆んど紫色色素のみからなる色素混合物が得られた（収量, 1g/l）。この紫色色素混合物の TLC パターンは Fig. 1 に示す通りである。



TLC pattern of ether extract

Aluminum oxide ; CHCl_3

Fig. 1

この色素混合物をシリカゲルカラム上ベンゼンと酢酸エチルの混合溶媒を展開溶媒としてクロマトグラフィーに付した。ベンゼンのみで溶出する部分を A 群とし、5% 酢酸エチル濃度で溶出する分画を B 群、10% 酢酸エチル濃度で溶出する分画を C 群、最後に 30% 濃度で溶出する色素を D 群とした。

石油エーテル部色素の大部分は A 群であった。

このように A, B, C, D 群に大別した色素をそれぞれシリカゲルあるいはアルミナカラムクロマトグラフィーにより再分離するとともに、溶媒に対する溶解度の違いを利用して、A 群は A-1 (4), A-2 (5), A-3 (6), A-4 (7) に、B 群は B-1 (8), B-2 (9), B-3 (10), B-4 (11) に、C 群は C-1 (12), C-2 (13) に分離した。D 群 (14) は 1 種類であった（これらの分離方法は実験の部

に詳述した)。

これらの物質は後で述べるように asterriquinone (1) と同一骨格を持つ化合物群であったので asterriquinone (AQ) 類と命名しこれを総称名に使い, 例えば AQ-A-1, AQ-B-1 などと称することにした。

以上の単離操作を Chart 3 に示す。

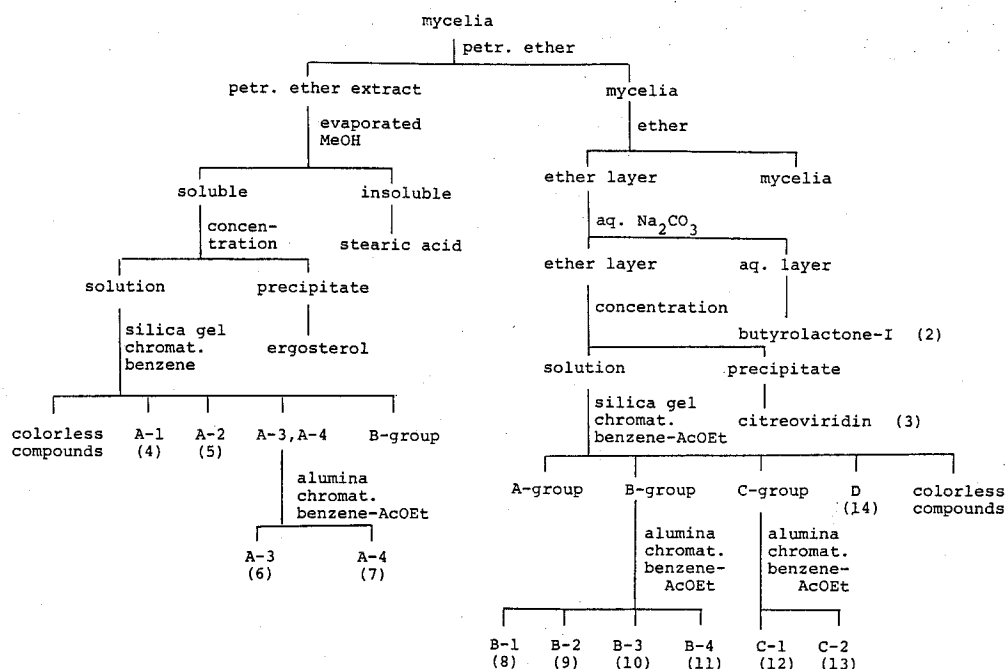


Chart 3

ii) *A. terreus* IFO 6346 株の紫色色素の単離

A. terreus IFO 6346 株を *A. terreus* IFO 8835 株の場合と同じ方法で培養後, 菌体をエーテル抽出した。エーテル抽出部の溶媒を留去後得られた残渣を修酸処理シリカゲルを用いカラムクロマトグラフィーに付しベンゼンで展開して溶出する赤紫色の分画をさらにシリカゲル TLC で分離した。この株には上述の AQ-A-1 ~ AQ-D の色素は存在せず, 新規に asterriquinone 同族体の 2 色素が単離されたのでそれぞれ AQ-E (15), AQ-F (16) と命名した。

第2節 Asterriquinone 類の構造

単離した13種の asterriquinone 類の性質を Table 1 に示す。

これらの紫色色素群はいずれも光学不活性でUVスペクトルで280, 290 nm付近にインドール核の吸収, 490~520 nm付近にキノン核の吸収を示し, IRスペクトルで1650 cm⁻¹ 付近にキノンのカルボニル吸収を示す (Fig.2 に一例として AQ-B-1 (8), AQ-D (14) の IR スペクトルと UV スペクトルを示す)。この色素群は, Na₂S₂O₄ または水酢酸中亜鉛末で還元すると無色のキノール体に変化し, 空気酸化またはFeCl₃酸化すると再びもとのキノン体にもどるので, 1,4-benzoquinone 構造を持つことが推定された。¹H-NMR スペクトルでは AQ-E (15) を除くいずれの色素も2個のメトキシ基のシグナルを示したが, 脱メチル化によりdihydroxy 体を与えた。これらの dihydroxy 体のキノンのカルボニル吸収は約1630 cm⁻¹ に認められた。すべての asterriquinone 類の基本となる骨格を持っている AQ-D (14) の ¹³C-NMR スペクトルでは, ベンゾキノン核の炭素のシグナルは δ 184.2 (C=O), 154.1 (C-OMe), 124.0 (C-indolyl) に観察されるが, その脱メチル体 (demethyl AQ-D (59)) ではこれらのうち1, 2, 4, 5位の炭素のシグナルは δ 167.1 にブロードなシングレットとしてあらわれる。AQ-D キノール体の dimethyl ether (82) の場合も δ 147.5 (C-OMe) と δ 122.1 (C-indolyl) の2個のシグナルのみが観察された (Table 2)。このような現象は 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone 核をもつ asterriquinone (1) や cochliodiol でも観察されており, ベンゾキノン核が2種類の等価な互変異性体として存在しているためと考えられている。⁵⁾

従って asterriquinone 類に 2,5-dimethoxy-1,4-benzoquinone 骨格が存在することが示唆された。このことは, 例えば demethyl AQ-C-1 (57) を無水酢酸中 DMSO で酸化すると dilactone 体 (23) が得られることから支持された。⁶⁾

一方, 後述するように asterriquinone 類を H₂O₂ 酸化すると indole-3-carboxylic acid やそのプレニル化誘導体を得られた。このような性質は asterriquinone (1) の場合とよく対応するので, AQ-E (15) を除く紫色色素群は, 3,6-bis (indol-3-yl) -2,5-dimethoxy-1,4-benzoquinone 骨格を持つと推定した。また分子式および ¹H-NMR, マススペクトルの比較からこれらの asterriquinone

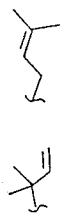
Compounds	mp °C	Formula (M ⁺ m/z)	Number of C ₅ H ₉ Groups 	UV λ ^{EtoH} _{max} nm	IR ν _{max} ^{KBr} cm ⁻¹
Asterriquinone (1)	218--220	C ₃₂ H ₃₀ N ₂ O ₄ (506)	2	282, 290, 482	3400, 1640
AQ-A-1 (4)	167--168	C ₃₄ H ₃₄ N ₂ O ₄ (534)	2	295, 299, 490	1650
AQ-A-2 (5)	189--192	C ₃₉ H ₄₂ N ₂ O ₄ (602)	1	283, 292, 374, 505	3410, 3310, 1650
AQ-A-3 (6)	112--114	C ₃₄ H ₃₄ N ₂ O ₄ (534)	2	284, 292, 374, 516	3320, 1650
AQ-A-4 (7)	252--253	C ₃₉ H ₄₂ N ₂ O ₄ (602)	2	284, 291, 390, 497	3375, 1650
AQ-B-1 (8)	208--209	C ₃₄ H ₃₄ N ₂ O ₄ (534)	1	285, 292, 382, 522	3375, 1655
AQ-B-2 (9)	199--200	C ₃₄ H ₃₄ N ₂ O ₄ (534)	1	283, 292, 372, 518	3375, 1650
AQ-B-3 (10)	148--150	C ₂₉ H ₂₆ N ₂ O ₄ (466)	1	284, 290, 484	3375, 1650
AQ-B-4 (11)	>300	C ₃₄ H ₃₄ N ₂ O ₄ (534)	2	284, 292, 385, 502	3380, 1645
AQ-C-1 (12)	213--214	C ₂₉ H ₂₆ N ₂ O ₄ (466)	1	283, 291, 367, 510	3345, 1645
AQ-C-2 (13)	202--203	C ₂₉ H ₂₆ N ₂ O ₄ (466)	-	285, 290, 485	3350, 1645
AQ-D (14)	>300	C ₂₄ H ₁₈ N ₂ O ₄ (398)	-	284, 290, 488	3330, 1635
AQ-E (15)	108--112	C ₃₅ H ₃₄ N ₂ O ₅ (562)	2	280, 288, 526	3350, 1775, 1675
AQ-F (16)	213--215	C ₃₄ H ₃₄ N ₂ O ₄ (534)	-	282, 289, 519	3370, 1660

Table 1

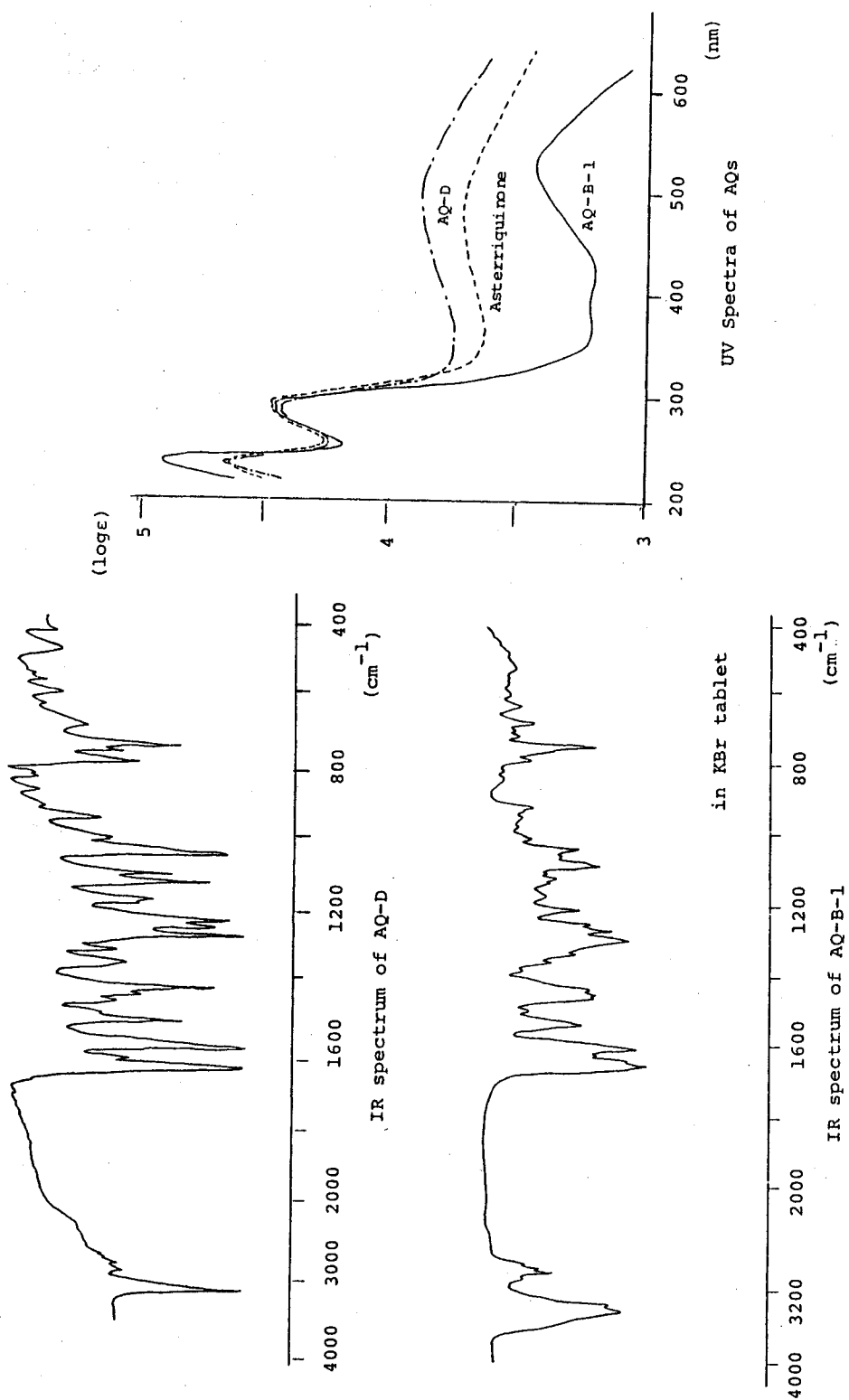
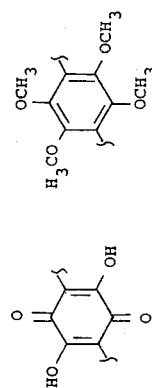
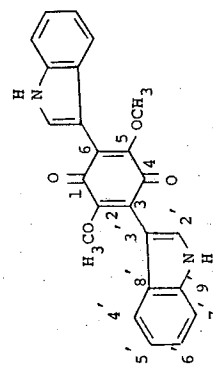


Fig. 2

Compounds	Quinone moiety			Indole moiety								
	1,4	2,5	3,6	2'	3'	4'	5'	6'	7'	8'	9'	OCH ₃
AQ-D (14)	184.2	154.1	124.0	129.8	105.7	122.1	122.1	120.3	112.3	127.9	137.3	60.3
Demethyl AQ-D (59)	167.1	167.1	111.0	127.2	104.8	120.8	121.3	118.5	111.2	126.3	135.6	-
Dimethyl AQ-D quinol (82)	147.5	147.5	122.1	125.1	106.9	120.2	120.8	118.5	111.3	127.0	135.8	60.2
AQ (1)	X	X	113.9	128.2	102.4	121.1	122.0	119.1	113.8	128.0	135.4	-
Dimethyl-AQ (AQ-A-1)	184.0	153.2	113.8	130.0	103.4	121.0	121.7	119.9	113.8	128.7	135.2	60.4
Cochliodinol	168.5	168.5	112.1	126.1	106.7	123.0	127.1	120.4	111.5	133.1	135.6	-
Diacetyl- cochliodinol	180.5	145.5	129.4	131.5	104.8	123.7	127.3	121.4	112.1	134.3	136.0	-



(59)

(82)

Table 2

類間の構造の相違点はイソプレン側鎖の種類と数、置換位置^{*)}にあると推定した (Table 1 参照)。

イソプレン側鎖の置換位置を決定するため H_2O_2 ならびに過酢酸によるベンゾキノン核の酸化的開裂を行ったが、酸化反応産物の収率は 2,5-dimethoxy-1,4-benzoquinone 体を用いた場合よりも 2,5-dihydroxy 体を用いた場合の方が良く⁷⁾、またイソプレン側鎖に二重結合が存在すると副生成物が多くなるので、側鎖の二重結合を飽和し、メトキシ基の脱メチル化を行った後に酸化反応を行った。

以下に各化合物の構造について述べる。

1) AQ-A-1 (4)

AQ-A-1 (4) は MeOH から再結晶し、赤紫色針状晶として得た。4 の ^1H -NMR スペクトルは asterriquinone (1) のそれと酷似しているが水酸基に起因するシグナルは認められず、代りに δ 3.80 に 2 個のメトキシ基のシグナルを示している。従って 4 は 1 の dimethyl ether 体と推定される。1 を CH_2N_2 でメチル化したところ 4 が得られ、4 の脱メチル化により 1 が得られたのでこの推定の正しいことが証明された。

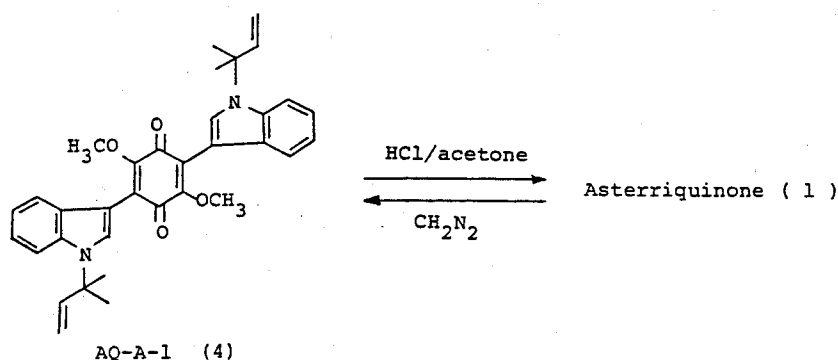


Chart 4

*) N-1 あるいは C-2 置換 1,1-dimethyl-2-propenyl 基におけるメチル基の chemical shift 値は、各々 δ 1.76 ~ 1.86, δ 1.37 ~ 1.54 であるから両者を区別することは可能である。

ii) AQ-D (14)

AQ-D (14) はアセトンから再結晶し、暗紫色プリズム晶として得た。14 の ^1H -NMR スペクトルは δ 3.77 に 2 個のメトキシ基, δ 6.95~7.65 に 10 個の芳香族プロトン, δ 11.60 に 2 個のインドール核 NH プロトンのシグナルを示すが, イソプレレン鎖に起因するシグナルは示さない。14 を氷酢酸中 HBr と共に 1 時間加熱還流したところ組成 $\text{C}_{22}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4$, mp $> 300^\circ\text{C}$ の 59 が得られた。59 の ^1H -NMR スペクトルではメトキシ基のシグナルが消失し代って δ 10.76 に 2 個の水酸基のプロトンのシグナルが新生し, IR スペクトルではキノンカルボニルの吸収が 1630cm^{-1} に認められる。従って 59 は 14 の脱メチル体と結論した。59 をアルカリ性で H_2O_2 酸化したところ, indole-3-carboxylic acid (17) が 35 % の収率で得られた。

以上の結果より AQ-D (14) の構造は 3,6-bis(indol-3-yl)-2,5-dimethoxy-1,4-benzoquinone であることが明らかとなった。本化合物の構造は 1982 年に E. Schwenner による X 線解析実験でさらに確認された⁸⁾。

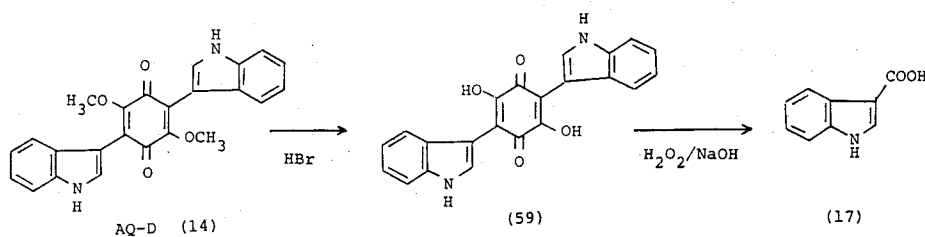


Chart 5

iii) AQ-C-1 (12)

AQ-C-1 (12) はベンゼンから再結晶し暗紫色針状晶として得た。 ^1H -NMR スペクトルは δ 3.66 と δ 3.71 に 2 個のメトキシ基のプロトン, δ 6.94~7.64 に 9 個の芳香族プロトン, δ 11.01 と δ 11.57 に 2 個のインドール核 NH プロトンのシグナルを示すほか, δ 1.46 に gem. dimethyl 基のプロトンのシグナルと δ 5.01 (1H, d, $J=10\text{Hz}$), 5.05 (1H, d, $J=18\text{Hz}$), 6.09 (1H, dd, $J=18, 10\text{Hz}$) にビニルプロトンの ABX タイプのシグナルを示している。従って 12 の分子内には 1,1-dimethyl-2-propenyl 基が存在することを推定した。12 を Pd-C 存在下接触還元したところ 2 モルの水素を吸収し組成 $\text{C}_{29}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_4$, mp $206\sim 208^\circ\text{C}$ の無

色化合物(18)が得られた。18の ^1H -NMRスペクトルでは1,1-dimethyl-2-propenyl基のシグナルに代って δ 0.71 (3H, t, $J=7.5$ Hz), 1.32 (6H, s), 1.68 (2H, q, $J=7.5$ Hz)に1,1-dimethylpropyl基に起因するシグナルが認められ、さらに δ 5.42に2個の水酸基のプロトンのシグナルが新生している。IRスペクトルではカルボニル領域に吸収が認められない。18を FeCl_3 で処理したところ組成 $\text{C}_{29}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4$, mp 245~247°Cのキノン体(AQ-HC-1*, 19)に変化した。従って18はイソプレン側鎖の二重結合が飽和したキノール体であると結論した。次に19をHBrを用いて脱メチル化し組成 $\text{C}_{27}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4$, mp 240~242°Cの脱メチル体(demethyl AQ-HC-1, 20)に誘導した。20をアルカリ性で H_2O_2 酸化して17を得、また過酢酸による酸化で組成 $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{NO}_3$, mp 137~138°Cの21を得た。21はIRスペクトルで3150, 3100, 1685, 1575 cm^{-1} に吸収帯を示すからアミド基とカルボキシル基の存在が推定された。その ^1H -NMRスペクトルは、 δ 0.83 (3H, t, $J=7.5$ Hz), 1.20 (6H, s), 1.60 (2H, q, $J=7.5$ Hz)の1,1-dimethylpropyl基に起因するシグナルのほか δ 7.07~8.78のベンゼン環上の隣接した4個のプロトンのシグナル、 δ 10.63のNHおよび δ 11.00のOHのプロトンのシグナルを示した。21はさらにHClによる加水分解でanthranilic acid (22)を与えた。従って21の構造はN-(2,2-dimethylbutyroyl)anthranilic acidであると結論した⁹⁾。

一方、AQ-C-1の脱メチル体(57)をDMSOと無水酢酸で処理したところ組成 $\text{C}_{27}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4$, mp >300°Cの橙赤色針状晶(23)が得られた。そのIRスペクトルではキノンの吸収は消失し、代って1800 cm^{-1} と1756 cm^{-1} にラクトンの吸収の新生が認められた。またUVスペクトルは480 nmに吸収極大を示した。これらを3,6-bis[5-(3-methyl-2-butenyl)indol-3-yl]furo[3,2-b]furan-2,5-dione構造をもつ cochliodione のスペクトルデータと比較したところよく一致した。従って23は57の2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone部分が酸化的に開環して生じた dilactone 体であると結論した。

以上の実験結果より12のイソプレン側鎖はインドール核2位に置換していることが明らかとなり、AQ-C-1(12)の構造は3-[2-(1,1-dimethyl-2-

*) 以下側鎖を水素化した化合物はAQ-HC-1, AQ-HC-2, AQ-HB-3のようにHを加えて表現する。

propenyl) indol-3-yl] -6-(indol-3-yl)-2,5-dimethoxy-1,4-benzoquinone
であることが明らかになった。

以上の AQ-C-1 (12) に関する諸反応を Chart 6 に示す。

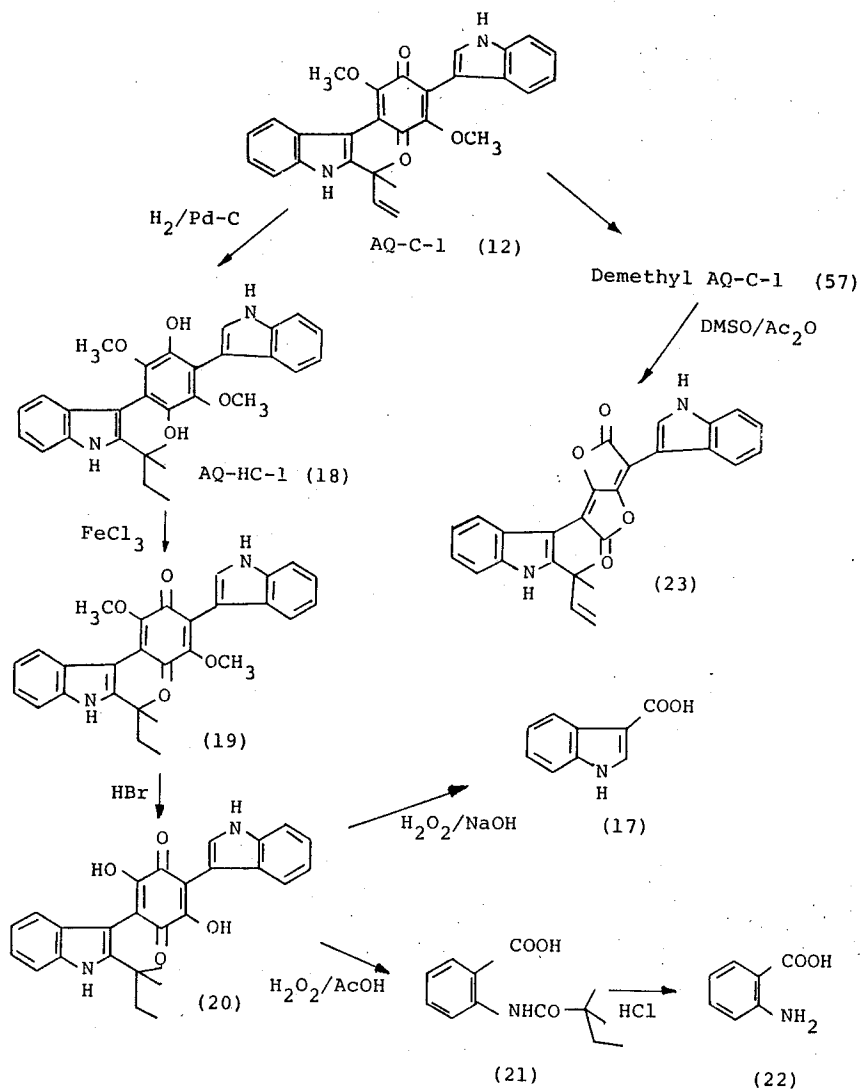


Chart 6

IV) AQ-C-2 (13)

AQ-C-2 (13) は MeOH から再結晶し暗紫色針状晶として得た。13 は 1H -NMR スペクトルにおいて δ 1.78 (6H, s), 3.64 (2H, d, $J=7.5Hz$), 5.50 (1H,

t, $J=7.5\text{ Hz}$) に 3-methyl-2-butenyl 基に起因するシグナルを示す。このイソブレン側鎖の置換位置の決定は AQ-C-1 (12) の場合と同様に行った。即ち、13 を Pd-C 存在下接触還元後 FeCl_3 酸化して側鎖の二重結合を飽和した組成 $\text{C}_{29}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4$, mp $242\sim 244^\circ\text{C}$ の dihydro 体 (AQ-HC-2, 24) を得、これを脱メチル化し組成 $\text{C}_{27}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4$, mp $262\sim 265^\circ\text{C}$ の脱メチル体 (demethyl AQ-HC-2, 25) に誘導した。25 をアルカリ性で H_2O_2 酸化したところ 17 と組成 $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{NO}_2$, mp $195\sim 197^\circ\text{C}$ の 26 が得られた。26 はエールリッヒ反応陽性 (赤紫色) で、その UV スペクトルは 287 nm に吸収極大を示し、分子中にインドール核の存在することが推定された。IR スペクトルでは $3380, 3330, 1640\text{ cm}^{-1}$ に吸収帯が認められ、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルでは $\delta\ 0.93$ (6H, d), $1.33\sim 1.87$ (3H, m), 2.90 (2H, t) に 3-methylbutyl 基に起因するシグナル, $\delta\ 7.95$ にインドール核 2 位のプロトンのシグナル, $\delta\ 6.98\sim 7.97$ に 3 個の芳香族プロトンの ABC タイプのシグナル, および $\delta\ 10.83$ にインドール核 NH プロトンのシグナルが観察される。以上のスペクトルデータより 26 はインドール核の 7 位または 4 位に 3-methylbutyl 基の置換した indole-3-carboxylic acid であると推定された。一方 25 を過酢酸で酸化したところ組成 $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{NO}_2$, mp $123\sim 124^\circ\text{C}$ の 27 が得られた。その IR スペクトルは $3480, 3350, 1670\text{ cm}^{-1}$ に吸収を示し、アントラニル酸の場合と類似している。27 を 210°C で 15 分間加熱したところ油状物質 (28) が得られた。この物質の組成は高分解能マススペクトルより $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{N}$ と決定された。28 はアセチル化により組成 $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{NO}_2$, mp $98\sim 99^\circ\text{C}$ の 29 を与えた。29 の IR スペクトルは $3380, 1650, 1535\text{ cm}^{-1}$ にアミド基由来の吸収を示し、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルは 3-methylbutyl 基に起因するシグナルとベンゼン環上の隣接した 4 個のプロトンのシグナル, 1 個のアセチル基のプロトンのシグナルを示した。従って 29 は 2-(3-methylbutyl) acetanilide であると推定された。またこのことは標品との比較同定により証明された。¹⁰⁾ 従って 27 の構造は 3-(3-methylbutyl) anthranilic acid であり、26 の構造は 7-(3-methylbutyl) indole-3-carboxylic acid であることが明らかとなった。

以上の結果より AQ-C-2 (13) の構造は 3-(indol-3-yl)-6-[7-(3-methyl-2-butenyl) indol-3-yl]-2,5-dimethoxy-1,4-benzoquinone と決定された。

AQ-C-2 (13) に関する諸反応を Chart 7 に示す。

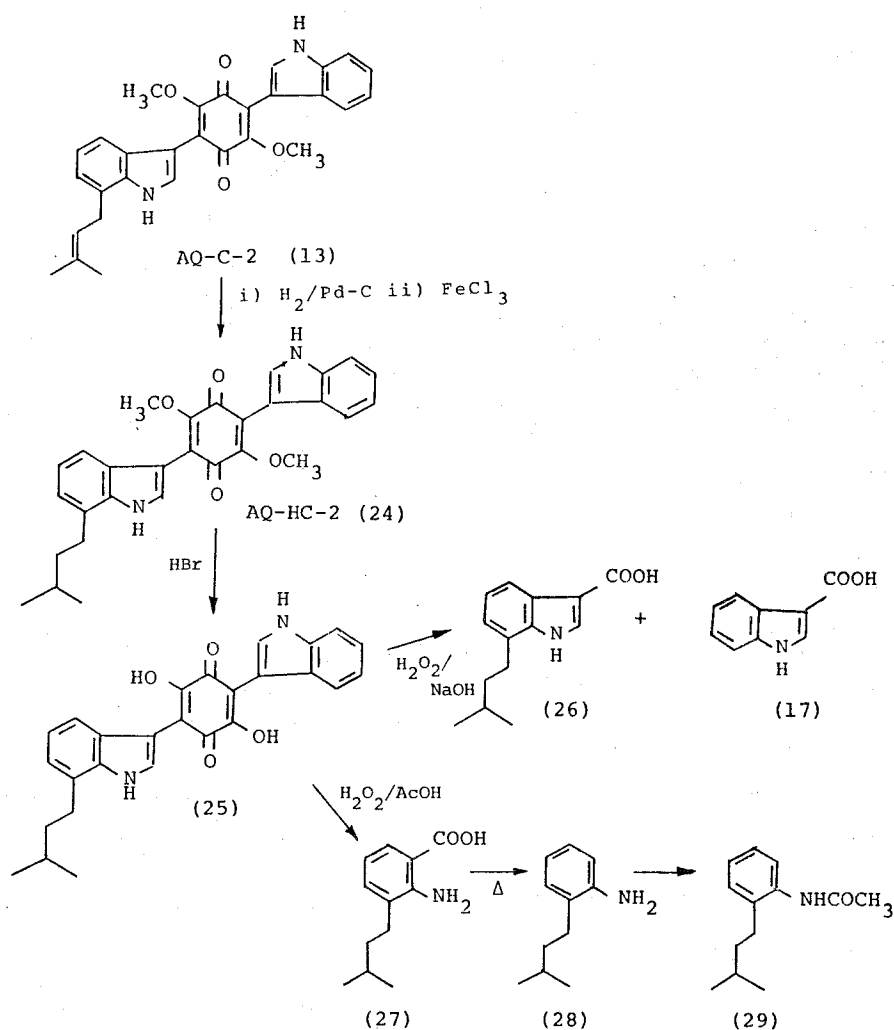


Chart 7

V) AQ-B-1 (8)

AQ-B-1 (8) はベンゼンから再結晶し、紫色プリズム晶として得た。 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルでは δ 1.52 (6H, s), 5.14 (1H, d, $J=10\text{Hz}$), 5.18 (1H, d, $J=18\text{Hz}$), 6.12 (1H, d, $J=18, 10\text{Hz}$) の 1,1-dimethyl-2-propenyl 基に起因するシグナルと δ 1.84 (6H, s), 3.62 (2H, d, $J=7.5\text{Hz}$), 5.20 (1H, t, $J=7.5\text{Hz}$) の 3-methyl-2-butenyl 基に起因するシグナルが認められる。8 を Pd-C 存在下接触還元後 FeCl_3 酸化して得た組成 $\text{C}_{34}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_4$, mp 255 ~ 257°C

の tetrahydro 体 (AQ-HB-1, **30**) は脱メチル化反応により組成 $C_{32}H_{34}N_2O_4$, mp 212~214°C の反応産物 (demethyl AQ-HB-1, **31**) を与えた。このものはアルカリ性下 H_2O_2 酸化により反応産物, **21**, **26** および **27** を与えた。

従って AQ-B-1 (**8**) の構造は 3-[2-(1,1-dimethyl-2-propenyl)indol-3-yl]-6-[7-(3-methyl-2-butenyl)indol-3-yl]-2,5-dimethoxy-1,4-benzoquinone であることが明らかになった (Chart 8)。

VI) AQ-B-2 (**9**)

AQ-B-2 (**9**) はベンゼンから再結晶し、暗紫色プリズム晶として得た。**9** の 1H -NMR スペクトルは AQ-B-1 (**8**) のそれと類似し、 δ 1.48 (6H, s), 5.09 (1H, d, $J=10.5$ Hz), 5.13 (1H, d, $J=17.5$ Hz), 6.07 (1H, dd, $J=17.5$, 10.5 Hz) の 1,1-dimethyl-2-propenyl 基に起因するシグナルと δ 1.86 (3H, s), 1.88 (3H, s), 3.57 (2H, d, $J=8$ Hz), 5.42 (1H, t, $J=8$ Hz) の 3-methyl-2-butenyl 基に起因するシグナルを示すほか、 δ 3.67 と δ 3.76 に 2 個のメトキシ基、 δ 6.97~7.58 に 8 個の芳香族プロトン、 δ 8.22 と δ 8.63 に 2 個のインドール核 NH プロトンのシグナルを示す。**9** は Pd-C 存在下接触還元後 $FeCl_3$ 酸化により組成 $C_{34}H_{38}N_2O_4$, mp 196~197°C の tetrahydro 体 (AQ-HB-2, **32**) を与えた。**32** の脱メチル体 (**33**), $C_{32}H_{34}N_2O_4$, mp 212~214°C, をアルカリ性で H_2O_2 酸化したところ **17** が得られ、過酢酸酸化したところ組成 $C_{18}H_{27}NO_3$, mp 116~117°C の **34** が得られた。**34** の IR スペクトルは 3300, 1700, 1655 cm^{-1} に吸収を示し、 1H -NMR スペクトルは δ 0.90 (3H, t, $J=7.5$ Hz), 1.32 (6H, s), 1.68 (2H, q, $J=7.5$ Hz) の 1,1-dimethylpropyl 基に起因するシグナル、 δ 0.92 (6H, d), 1.40~1.60 (3H, m), 2.58 (2H, t) の 3-methylbutyl 基に起因するシグナルと δ 7.24~7.84 の 3 個の芳香族プロトンのシグナルを示した。**34** の HCl による加水分解産物は **27** と同定された。従って **33**, ひいては AQ-B-2 (**9**) の 2 個のプレニル基は同一インドール核の 2 位と 7 位に存在することが明らかとなり、AQ-B-2 (**9**) は 3-[2-(1,1-dimethyl-2-propenyl)-7-(3-methyl-2-butenyl)indol-3-yl]-6-(indol-3-yl)-2,5-dimethoxy-1,4-benzoquinone であることが証明された (Chart 9)。

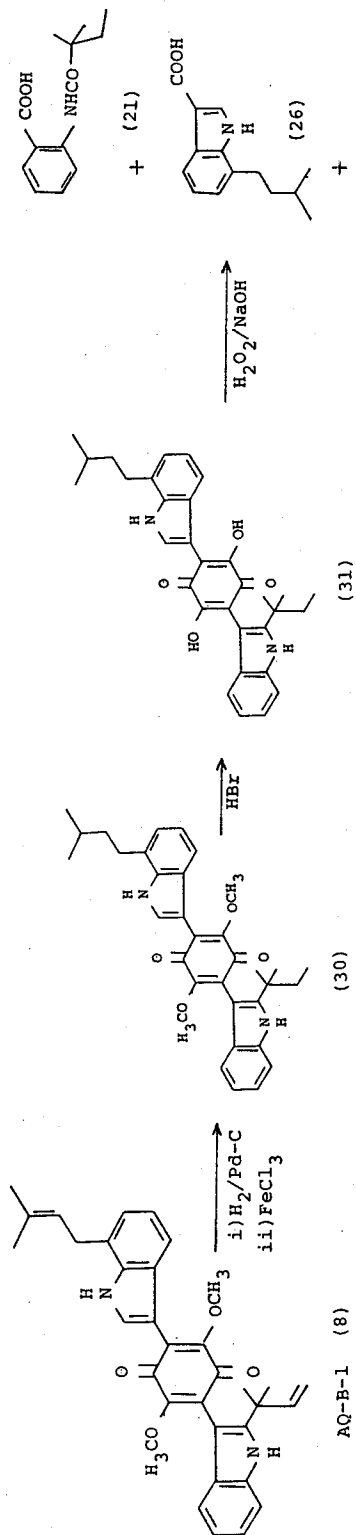


Chart 8

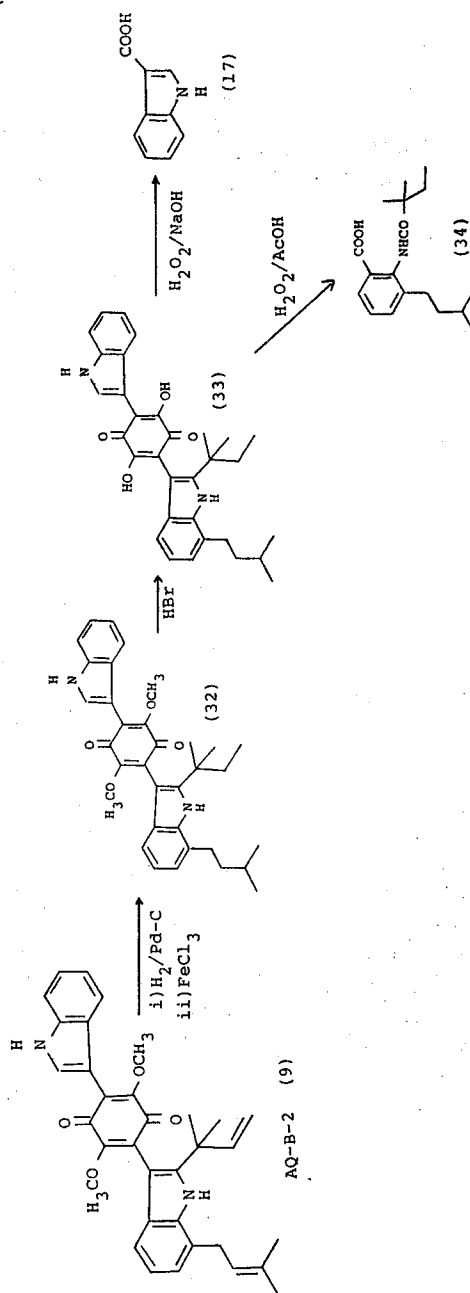


Chart 9

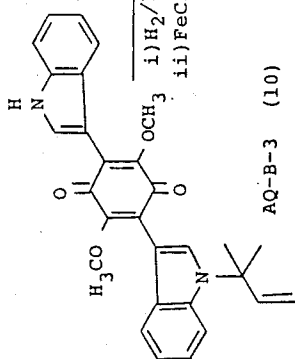
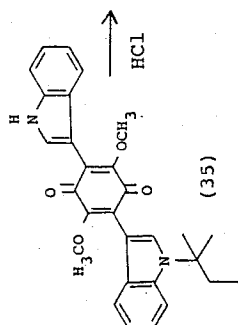
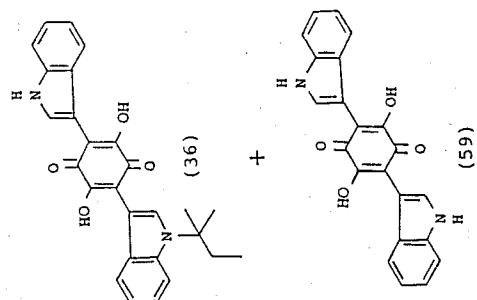
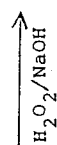
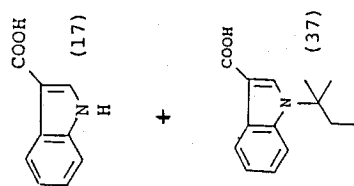
vii) AQ-B-3 (10)

AQ-B-3 (10) はシクロヘキサンより再結晶し、赤紫色粉末として得た。¹H-NMR スペクトルは δ 1.37 (6H, s), 4.73 (1H, dd, $J=9.5, 1.5$ Hz), 4.93 (1H, dd, $J=17, 1.5$ Hz), 6.06 (1H, dd, $J=17, 9.5$ Hz) の 1,1-dimethyl-2-propenyl 基に起因するシグナルと δ 3.73, 3.75 の 2 個のメトキシ基, δ 7.05 ~ 7.69 の 10 個の芳香族プロトン, δ 8.72 の 1 個のインドール核 NH プロトンのシグナルを示す。従って一方のインドール核窒素はプレニル基で置換されているものと推定された。10 も常法により接触還元後 FeCl₃ 酸化したところ組成 C₂₉H₂₈N₂O₄, mp 80~82°C の dihydro 体 (AQ-B-3, 35) を与えた。次に 35 を氷酢酸中 HCl で加熱還流したところ組成 C₂₇H₂₄N₂O₄, mp 191~193°C の 35 の脱メチル体 (demethyl AQ-HB-3, 36) と組成 C₂₂H₁₆N₂O₄, mp >300°C の demethyl AQ-D (59) とが得られた。一方, 36 をアルカリ性で H₂O₂ 酸化したところ組成 C₁₄H₁₇NO₂, mp 153°C の 37 が得られた。37 はエールリッヒ反応陽性 (赤紫色) で IR スペクトルは 1650 cm⁻¹ にカルボニル吸収を示し, ¹H-NMR スペクトルは δ 0.63 (3H, t, $J=7.2$ Hz), 1.73 (6H, s), 2.13 (2H, q, $J=7.2$ Hz) に 1,1-dimethylpropyl 基のプロトン, δ 7.07~8.13 に 5 個の芳香族プロトン, δ 11.06 に水酸基のプロトンのシグナルを示す。従って 37 は *N*-(1,1-dimethylpropyl) indole-3-carboxylic acid であると推定されたが, 実際 asterriquinone (1) より誘導して得た *N*-(1,1-dimethylpropyl) indole-3-carboxylic acid と比較, 同定された。

以上の結果より AQ-B-3 (10) は 3-[1-(1,1-dimethyl-2-propenyl)indol-3-yl]-6-(indol-3-yl)-2,5-dimethoxy-1,4-benzoquinone であることが明らかにされた (Chart 10)。

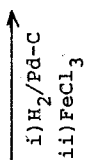
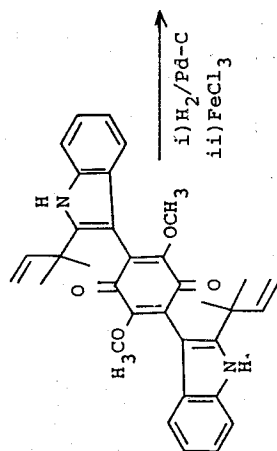
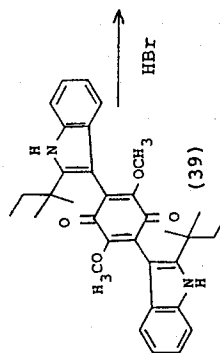
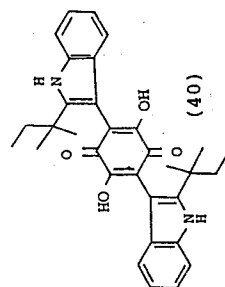
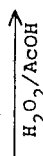
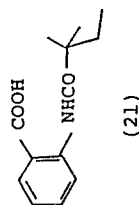
viii) AQ-B-4 (11)

AQ-B-4 (11) は MeOH から再結晶し、赤紫色板状晶として得た。¹H-NMR スペクトルは δ 1.55 に 4 個のメチル基のプロトン, δ 4.90~5.24 と δ 6.18 に 2 組のビニルプロトンの ABX タイプのシグナルを示し 2 個の 1,1-dimethyl-2-propenyl 基の存在を示唆する。11 はエールリッヒ反応が陰性で, その ¹H-NMR スペクトルにはインドール核 2 位のプロトンのシグナルが認められない。従って



AQ-B-3 (10)

Chart 10



AQ-B-4 (11)

Chart 11

本物質では 2 個のイソプレン側鎖はいずれもインドール核の 2 位に置換しているものと推定された。11 の側鎖を常法により還元し、組成 $C_{34}H_{38}N_2O_4$, mp $>300^{\circ}C$ の tetrahydro 体 (39) に誘導後, HBr で処理し組成 $C_{32}H_{34}N_2O_4$, mp $286\sim 289^{\circ}C$ の脱メチル体 (40) を得た。さらに 40 の過酢酸酸化により 21 が収率 29% で得られたので AQ-B-4 (11) の構造は 3,6-bis[2-(1,1-dimethyl-2-propenyl)indol-3-yl]-2,5-dimethoxy-1,4-benzoquinone であることが明らかとなった (Chart 11)。

IX) AQ-A-2 (5)

AQ-A-2 (5) はイソプロピルアルコールから再結晶し暗紫色プリズム晶として得た。 1H -NMR スペクトルは δ 1.49 (6H, s), 5.10 (1H, dd, $J=10$ Hz), 5.14 (1H, dd, $J=17.5$ Hz), 6.08 (1H, dd, $J=17.5, 10$ Hz) および δ 1.83 (6H, s), 1.88 (6H, s), 3.58 (4H, d, $J=7.5$ Hz), 5.44 (2H, t, $J=7.5$ Hz) にシグナルを示す。従って 5 の分子内には 1 個の 1,1-dimethyl-2-propenyl 基と 2 個の 3-methyl-2-butenyl 基の存在することが示唆された。このほかにも 1H -NMR スペクトルでは δ 6.90~7.50 に 7 個の芳香族プロトン, δ 8.16 と δ 8.50 にインドール核 NH プロトンのシグナルが観察された。5 の 3 個のイソプレン側鎖の置換位置は以下の分解反応によって明らかにされた。即ち, 5 を Pd-C 上接触還元後 $FeCl_3$ 酸化し組成 $C_{39}H_{48}N_2O_4$, mp $221\sim 222^{\circ}C$ の hexahydro 体 (AQ-HA-2, 41) とした後, HBr を作用せしめ組成 $C_{37}H_{44}N_2O_4$, mp $190.5\sim 192^{\circ}C$ の脱メチル体 (42) に導いた。42 はアルカリ性 H_2O_2 酸化により 26 と 27 とを与え, 過酢酸酸化により既述の 34 と組成 $C_{13}H_{15}NO_3$, mp $175\sim 177.5^{\circ}C$ の 43 とを与えた。43 の UV スペクトルは 240, 332 nm に吸収極大を示し, IR スペクトルは 3320, 3160, 1795, 1715 cm^{-1} に吸収帯を示すなど, isatoic acid anhydride の場合と類似している。また 1H -NMR スペクトルは δ 0.97 (6H, d), 1.43~1.93 (3H, m), 2.83 (2H, t) の 3-methylbutyl 基に由来するシグナルと δ 7.07~7.70 の 3 個の芳香族プロトンの ABC タイプのシグナルを示す。これらのスペクトルデータと酸化分解物の構造にもとづき 43 は, 3-(3-methylbutyl) isatoic acid anhydride であると推定された。

以上の実験結果より AQ-A-2 (5) は 3-[2-(1,1-dimethyl-2-propenyl)-7-(3-methyl-2-butenyl)indol-3-yl]-6-[7-(3-methyl-2-butenyl)-

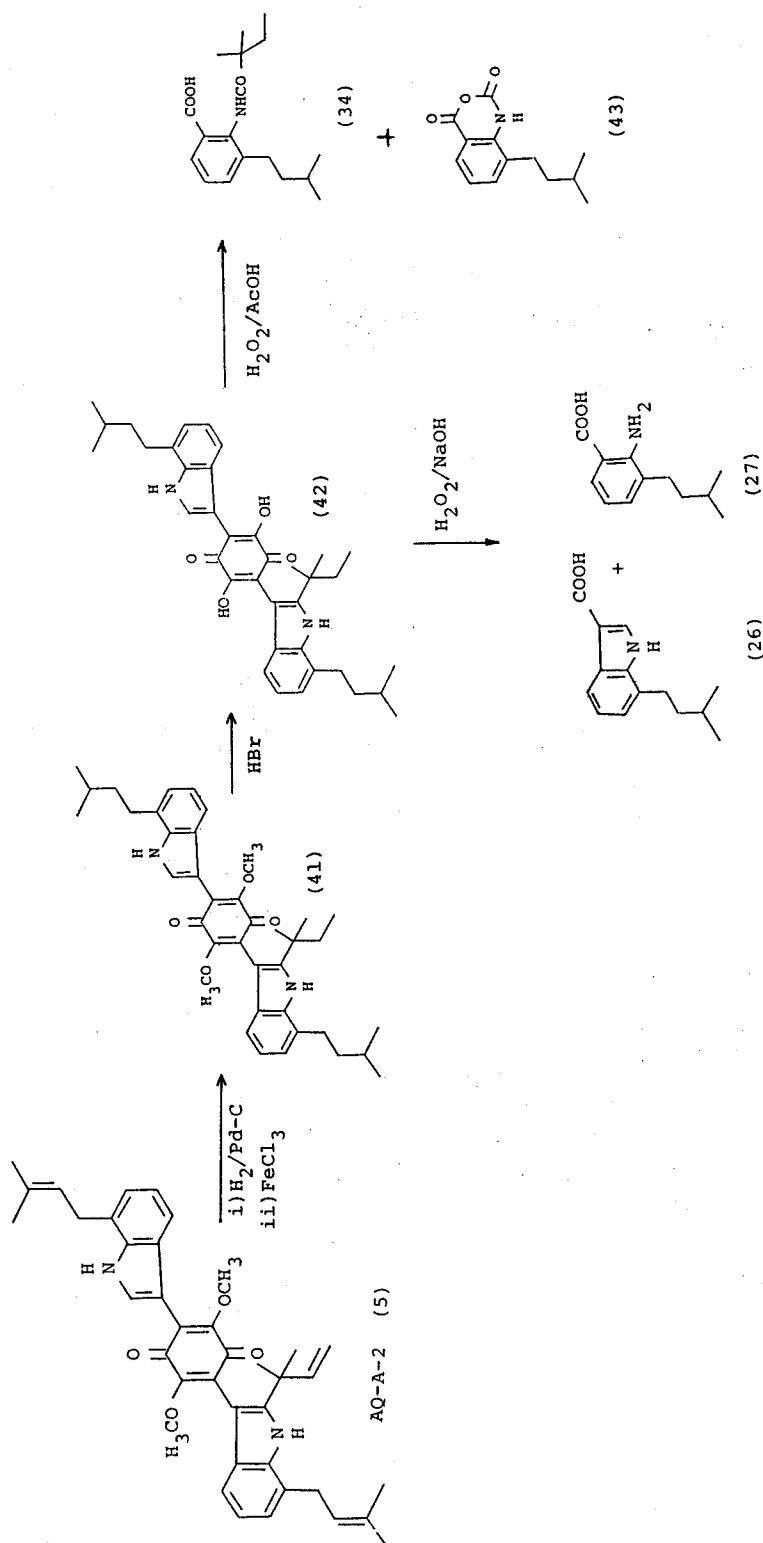


Chart 12

indol-3-yl]-2,5-dimethoxy-1,4-benzoquinone であることが明らかとなった (Chart 12)。

X) AQ-A-3 (6)

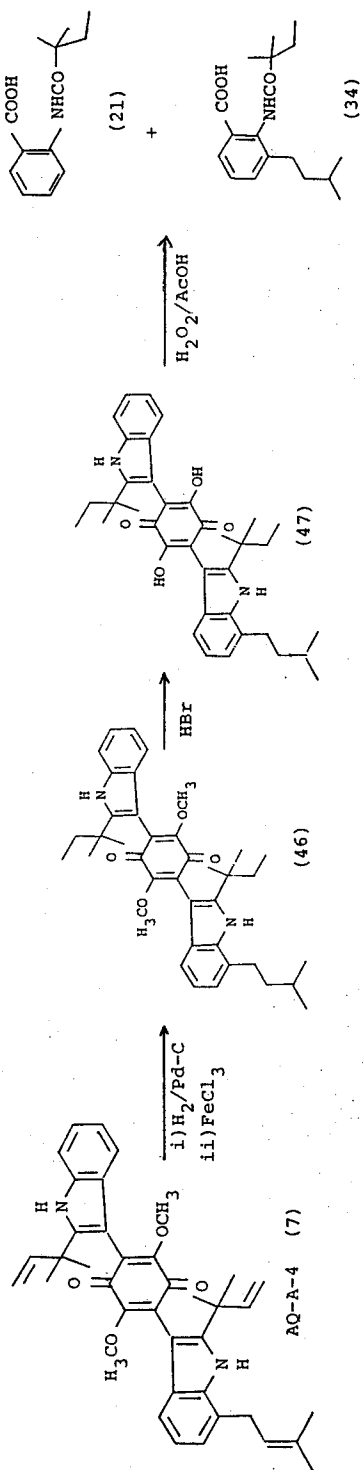
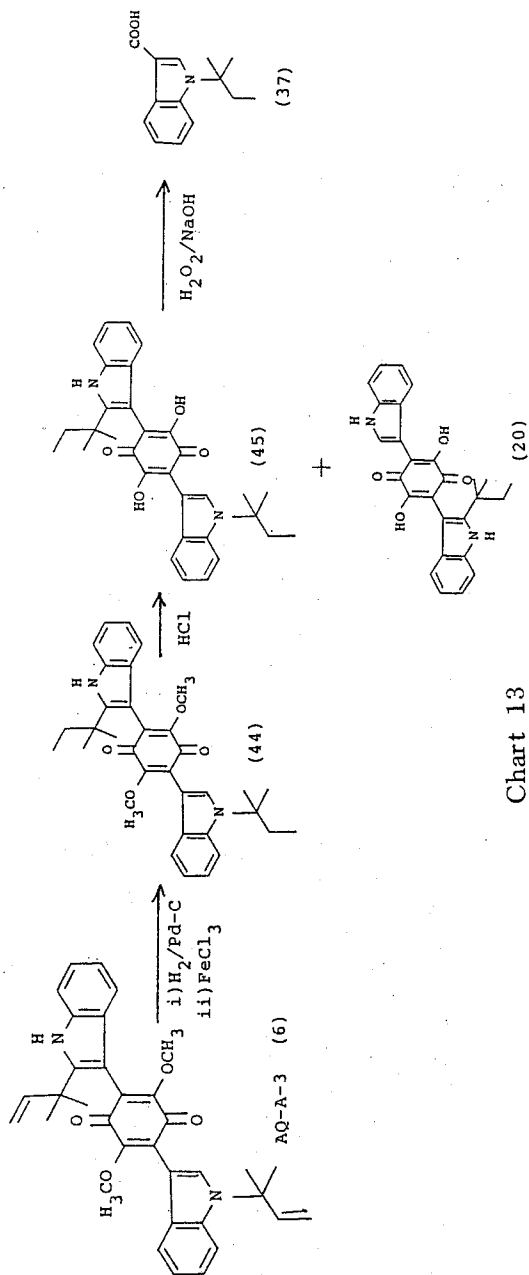
AQ-A-3 (6) は *n*-ヘキサンから再結晶し、暗紫色粉末として得た。¹H-NMR スペクトルは δ 1.37, 1.75 に各 2 個のメチル基のプロトンのシグナルと δ 4.73, 4.93, 6.06 および δ 5.05, 5.10, 6.08 に各 1 組のビニルプロトンの ABX タイプのシグナルを示す。従って、2 個の 1,1-dimethyl-2-propenyl 基の存在が示唆されるが、インドール核 NH プロトンのシグナルは δ 8.13 に 1 個しか認められないから 1 個のイソプレン側鎖はインドール核窒素に置換しているものと推定された。6 を Pd-C 上で接触還元後 FeCl₃ 酸化して組成 C₃₄H₃₈N₂O₄, mp 228~231°C の tetrahydro 体 (AQ-HA-3, 44) に誘導後、HCl を作用せしめたところ組成 C₃₂H₃₄N₂O₄, mp 268~274°C の 44 の脱メチル体 (45) と組成 C₂₇H₂₄N₂O₄, mp 240~242°C の脱メチル体とが得られた。後者の諸性質は既述の 20 の場合とよく一致し、直接比較により 20 と同定された。一方、45 はアルカリ性 H₂O₂ 酸化で 37 を与えた。

以上の実験結果より AQ-A-3 (6) は 3-[1-(1,1-dimethyl-2-propenyl) indol-3-yl]-6-[2-(1,1-dimethyl-2-propenyl) indol-3-yl]-2,5-dimethoxy-1,4-benzoquinone であることが明らかになった (Chart 13)。

XI) AQ-A-4 (7)

AQ-A-4 (7) はベンゼンから再結晶し、暗紫色プリズム晶として得た。¹H-NMR スペクトルは δ 1.45, 1.54, 1.82, 1.88 に 6 個のメチル基のプロトンのシグナル、 δ 5.06, 5.12, 6.08 と δ 5.14, 5.16, 6.10 に各 1 組のビニルプロトンの ABX タイプのシグナル、 δ 3.58 と δ 5.46 に互いにカップリングするメチンとメチレンのシグナルを示す。従って分子内に 2 個の 1,1-dimethyl-2-propenyl 基と 1 個の 3-methyl-2-butenyl 基が存在することが推定される。7 を接触還元後 FeCl₃ 酸化して得た組成 C₃₉H₄₈N₂O₄, mp 267~270°C の hexahydro 体 (AQ-HA-4, 46) に HBr を作用せしめ組成 C₃₇H₄₄N₂O₄, mp 262~267°C の脱メチル体 (47) を得た。さらに 47 の過酢酸酸化により既述の 21 と 34 を得た。

従って AQ-A-4 (7) は 3-[2-(1,1-dimethyl-2-propenyl) indol-3-yl]-



6-[2-(1,1-dimethyl-2-propenyl)-7-(3-methyl-2-butenyl)indol-3-yl]-2,5-dimethoxy-1,4-benzoquinone であることが明らかになった(Chart 14)。

XII) AQ-E (15)

AQ-E (15) は *n*-ヘキサンより再結晶し、紫色粉末として得た。IR スペクトルは他の *asterriquinone* 類と異なり 1675 cm^{-1} にキノンのカルボニル吸収のほか、 1775 cm^{-1} にアセチル基のカルボニル吸収も示す。また $^1\text{H-NMR}$ スペクトルは各 1 個のメトキシ基とアセチル基の存在を示す。15 の KOH による脱メチル化反応に際しては、アセチル基も同時に外れて組成 $\text{C}_{32}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_4$, mp $196\sim 199^\circ\text{C}$ の脱メチル体 (48) が得られた。このものは *asterriquinone* (1) をアセトン中 HCl 処理して得られるイソプレン側鎖の転位体、3,6-bis[2-(3-methyl-2-butenyl)indol-3-yl]-2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone (この化合物については第 3 節で述べる) と同一物であった。

従って AQ-E (15) は、3,6-bis[2-(3-methyl-2-butenyl)indol-3-yl]-2-acetyl-5-methoxy-1,4-benzoquinone であることが明らかになった(Chart 15)。

XIII) AQ-F (16)

AQ-F (16) はベンゼンより再結晶し、暗紫色プリズム晶として得た。 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルは、 δ 1.74 に 4 個のメチル基のプロトン、 δ 3.47 に 4 個のメチレンプロトン、 δ 5.39 に δ 3.47 のプロトンとカップリングする 2 個のメチンプロトンのシグナルを示すほか、 δ 3.73 に 2 個のメトキシ基、 δ 6.98~7.40 に 8 個の芳香族プロトンおよび δ 10.27 に 2 個のインドール核 NH プロトンのシグナルを示す。16 の KOH による脱メチル化により 48 が得られた。

従って AQ-F (16) は、3,6-bis[2-(3-methyl-2-butenyl)indol-3-yl]-2,5-dimethoxy-1,4-benzoquinone であることが明らかになった(Chart 15)。

Asterriquinone 類と同じ indolyl benzoquinone 骨格を持つ代謝産物としては、この他に A. Tayler らにより *Chaetomium globosum* から cochliodiol (1975年)⁵⁾、S. Natori らにより *Chaetomium murorum* から neocochliodiol (1981年)、*Chaetomium amygdalisporum* から isocochliodiol (1981年)¹¹⁾、さらに M.A.O'Leary

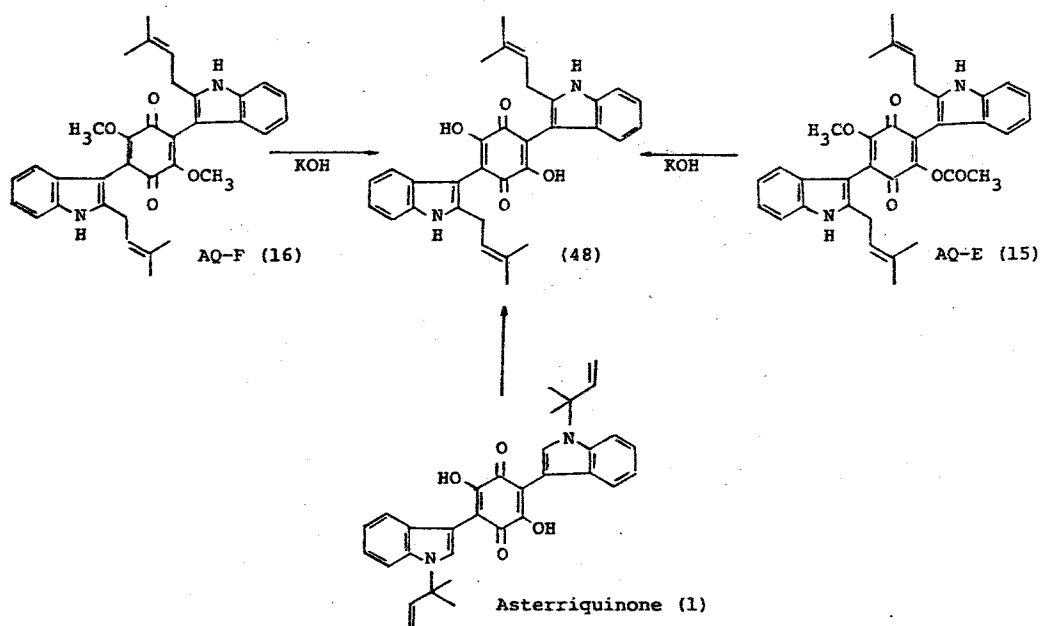
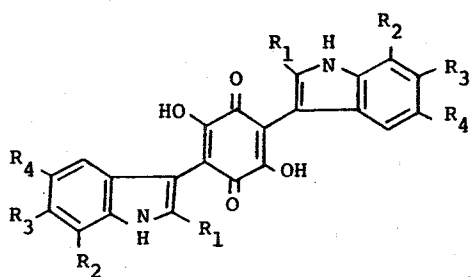


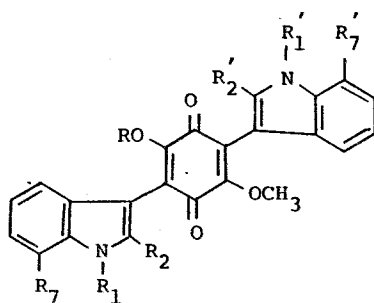
Chart 15



Cochliodiol	R ₄ =	R ₁ =R ₂ =R ₃ = H
Neocochliodiol	R ₃ =	R ₁ =R ₂ =R ₄ = H
Isocochliodiol	R ₂ =	R ₁ =R ₃ =R ₄ = H
Hinnuliquinone	R ₁ =	R ₂ =R ₃ =R ₄ = H

らにより *Nodulisporium hinnuleum* から AQ-B-4 の脱メチル体である hinnuli-quinone (1982年)¹²⁾ が単離されている。

今回著者が *A. terreus* から単離し、構造を明らかにした上記 13 種の asterriquinone 類の構造を Table 3 にまとめた。



Compounds	Position of Prenyl Groups in Asterriquinone	
R=CH ₃ AQ-A-1 (4)	R ₁ , R ₁ '	-
AQ-A-2 (5)	R ₂	R ₇ , R ₇ '
AQ-A-3 (6)	R ₁ , R ₂ '	-
AQ-A-4 (7)	R ₂ , R ₂ '	R ₇
AQ-B-1 (8)	R ₂	R ₇ '
AQ-B-2 (9)	R ₂	R ₇
AQ-B-3 (10)	R ₁	-
AQ-B-4 (11)	R ₂ , R ₂ '	-
AQ-C-1 (12)	R ₂	-
AQ-C-2 (13)	-	R ₇
AQ-D (14)	-	-
AQ-F (16)	-	R ₂ , R ₂ '
R=COCH ₃ AQ-E (15)	-	R ₂ , R ₂ '

Table 3

第3節 Asterriquinone 類の脱メチル化について

第2節で述べたように asterriquinone 類の構造決定に際しては H_2O_2 による酸化が極めて有効であった。その際、反応を容易にするため材料としては常に脱メチル体を用いたが、その脱メチル化反応は、イソプレン鎖に基づく副反応を避けるためイソプレン鎖の二重結合をまず飽和した後に行った。

また我々はこれら単離した asterriquinone 類の抗腫瘍性を調べたがいずれも特に強い活性を示さなかった。¹³⁾ 一方, asterriquinone (1) は強い抗腫瘍性を示すが, その dimethyl 体は抗腫瘍性を示さないこと, またイソプレン鎖を飽和すると活性が著しく低下する例があることなどが既にわかっていた。そこで今回単離した asterriquinone 類においても, それらの脱メチル体には強い抗腫瘍性が期待できるのではないかと考え, asterriquinone 類のイソプレン鎖の二重結合を残したまま脱メチル化することを試みた。このようにして得られた脱メチル体の中には予想通り強い抗腫瘍作用を示すものが多く出現したが, 一方脱メチル化反応の検討に際し興味深い副反応もいくつか認められた。本節ではこれら副反応についてまとめて記述する。

starting AQ	reaction time*	yield %	demethyl AQ Formula**	mp °C
AQ-A-1 (4)	1.5 hr	72	(49) $C_{32}H_{30}N_2O_4$	218-220
AQ-A-2 (5)	1	56	(50) $C_{37}H_{38}N_2O_4$	167-171
AQ-A-3 (6)	1	60	(51) $C_{32}H_{30}N_2O_4$	260-262
AQ-A-4 (7)	2.5	85	(52) $C_{37}H_{38}N_2O_4$	111-115
AQ-B-1 (8)	1.1	63	(53) $C_{32}H_{30}N_2O_4$	199-201
AQ-B-2 (9)	1	76	(54) $C_{32}H_{30}N_2O_4$	192-195
AQ-B-3 (10)	1	14	(55) $C_{27}H_{22}N_2O_4$	222-224
AQ-B-4 (11)	2.5	83	(56) $C_{32}H_{30}N_2O_4$	245-246
AQ-C-1 (12)	1.1	82	(57) $C_{27}H_{22}N_2O_4$	244-246
AQ-C-2 (13)	1	58	(58) $C_{27}H_{22}N_2O_4$	> 300
AQ-D (14)	1	59	(59) $C_{22}H_{14}N_2O_4$	> 300

* refluxing time with 1N KOH and EtOH (1:2, v/v).

** elementary analyses and MS were all reasonable.

Table 4

脱メチル化試薬としては、HCl, HBr, HI, BBr₃, AlBr₃およびKOHを検討した。これらの内、一般的に言って1N KOHと約1時間加熱処理する場合、最も副反応が少なく高収率で脱メチル体が得られたので動物試験用の試料はこの方法で製造した。得られた脱メチル体の性質と反応収率をTable 4に示す。この表に示すようにAQ-B-3 (10)の場合のみはKOHによる脱メチル化の収率は14%と低く動物試験にはHClによる脱メチル化(収率23%)で試料を調製した。

試薬としてBBr₃を使うとmono-demethoxy体が主に得られ、目的のdi-hydroxy体の収率は低かった。また、HCl, HBr, HIなどの酸を用いるとイソプレン側鎖に副反応が起り、目的の脱メチル体の収率の低下をきたした。

例えばインドール核のC-2位の1,1-dimethyl-2-propenyl基はこれらの脱メチル化試薬と加熱しても安定であるが、インドール核のN-1位に置換した1,1-dimethyl-2-propenyl基は転移や脱離を起し、またC-7位に置換した3-methyl-2-butenyl基はN-1との間で六員環を形成したり、水和化合物を与えたりした。これらの副反応はHClよりHBrを用いたときの方が起りやすかった。

副反応は次のように分類できる。

- 1) 部分的脱メチル化
- 2) イソプレン側鎖の脱離
- 3) イソプレン側鎖の転位
- 4) イソプレン側鎖の水和
- 5) イソプレン側鎖の環化

以下、順を追って説明する。

1) 部分的脱メチル化

Asterriquinone類を-70°CでBBr₃処理すると、mono-demethoxy体が収率よく得られる。例えばAQ-C-1 (12)ではmono-demethoxy AQ-C-1 (60), mp 154°Cが32%の収率で得られるのにdi-demethoxy AQ-C-1 (57), mp 244~246°Cの収率は18%であった。特にAQ-B-1 (8)ではmono-demethoxy体(61)の収率が46%にも達した。一方、AQ-B-3 (10)やAQ-D (14)はBBr₃処理してもmono-demethoxy体を殆んど与えず主生成物はdi-demethoxy体であった。従

って AQ-B-1 (8) や AQ-C-1 (12) ではインドール核の 2 位に置換するイソプレン側鎖が bulky な BBr_3 試薬のメトキシ基への接近を障害するため、この側鎖に近いメトキシ基は脱メチル化を受けにくくなるものと考えられる。従って 60 は 3-[2-(1,1-dimethyl-2-propenyl)indol-3-yl]-6-(indol-3-yl)-2-methoxy-5-hydroxy-1,4-benzoquinone であると推定される。

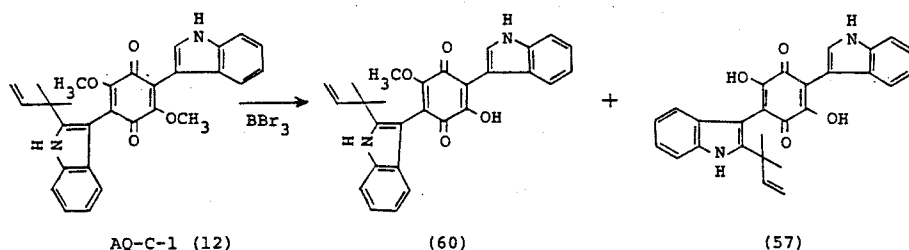


Chart 16

2) イソプレン側鎖の脱離

インドール核窒素にイソプレン鎖が置換した 1-(1,1-dimethyl-2-propenyl) tryptophan やその二重結合の飽和した 1-(1,1-dimethylpropyl) tryptophan を氷酢酸中 HCl と加熱した場合、前者では側鎖がインドール核 2 位と反応し五員環を形成し、後者では脱離反応が進行することを Fujino らは報告している¹⁴⁾

窒素置換イソプレン鎖をもつ asterriquinone 類においては側鎖が飽和、不飽和のいずれの場合にも、氷酢酸中 HCl の作用により脱離することが観察された。即ち、インドール核窒素に 1,1-dimethylpropyl 基が置換した AQ-HA-3 (44) は氷酢酸中 HCl と加熱還流することにより側鎖の脱離した demethyl AQ-HC-1 (20) を 57% の収率で与えた。また、AQ-HB-3 (35) では 3% の低収率ながら demethyl AQ-D (59) の生成が認められた。

また、窒素原子に 1,1-dimethyl-2-propenyl 基が置換した AQ-A-1 (4) からは 22% の収率で demethyl AQ-B-3 (55) が、AQ-B-3 (10) からは 24% の収率で demethyl AQ-D (59) が得られた。

このようなインドール核窒素に置換するイソプレン側鎖の脱離反応はこれら asterriquinone 類の構造を推定する上にも有効であった。

以上に述べた諸反応を Chart 17 に示す。

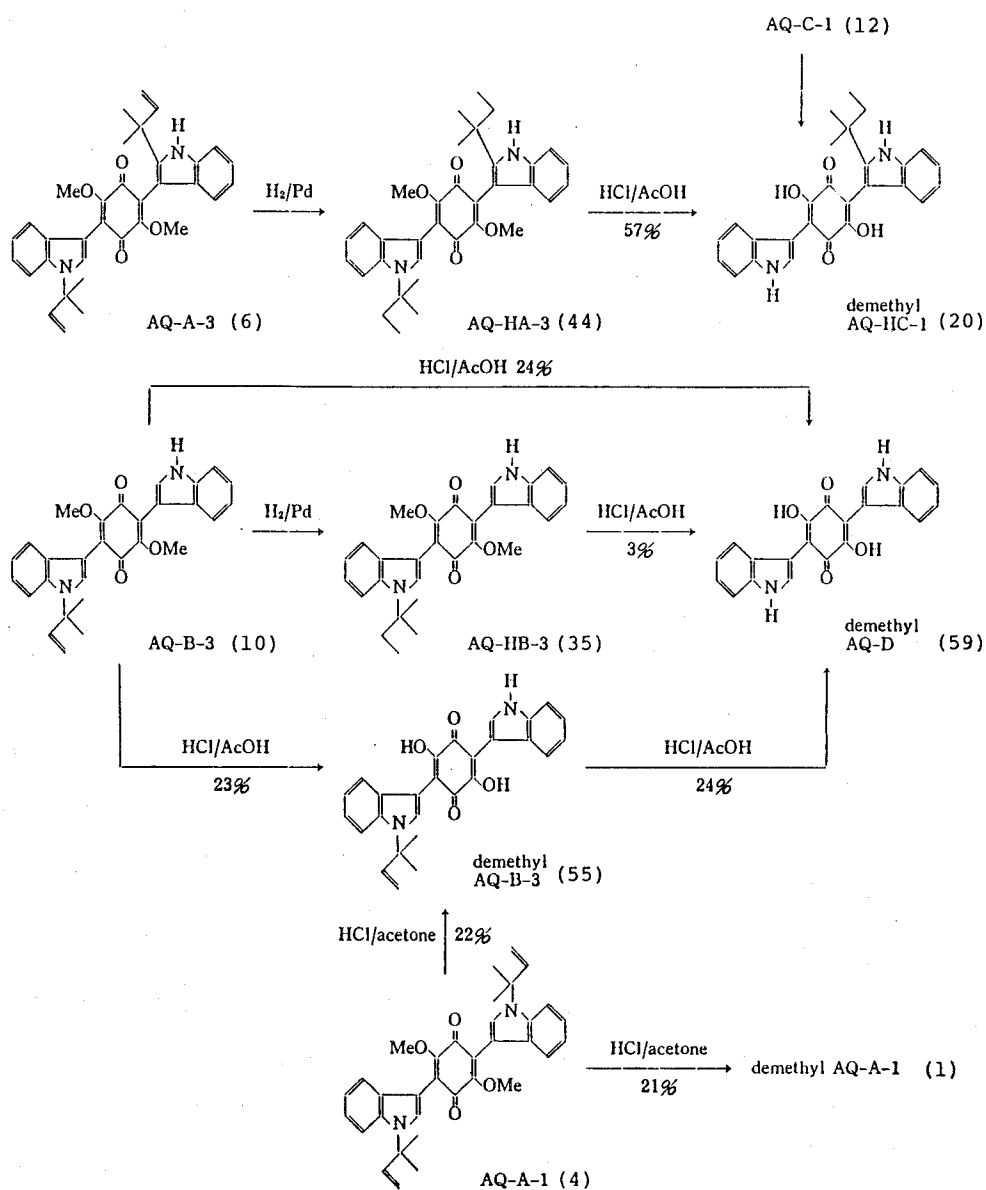


Chart 17

3) イソブレン側鎖の転移

インドール核窒素に側鎖を持つ AQ-B-3 (10) をアセトン中 HCl と 5 時間加熱還流したところ組成 $\text{C}_{27}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4$, mp 212~214°C の **62** が得られた。**62** の ^1H -NMR スペクトルでは 1,1-dimethyl-2-propenyl 基のシグナルが消失し代って δ 1.67 (6H, s), 3.45 (2H, d, $J=7.0\text{Hz}$), 5.34 (1H, t, $J=7.0\text{Hz}$) に

3-methyl-2-butenyl 基に起因するシグナルが認められた。また芳香族プロトンは δ 6.83~7.60 に 9 個しか観察されず、インドール核 NH プロトンのシグナルは δ 9.98 と δ 10.42 に 2 個観察された。従って **62** は AQ-B-3 (**10**) の窒素置換イソプレン側鎖がインドール核 2 位に Claisen 転位して生じた物質であると推定された。これを確認するため **62** を Pd-C 上で接触還元し組成 $C_{27}H_{24}N_2O_4$, mp 219~221°C の dihydro 体 (**63**) に誘導した後、過酢酸酸化したところ組成 $C_{13}H_{17}NO_3$, mp 82~83°C の **64** が得られた。**64** の IR スペクトルは **21** と類似し 3350, 3100, 1690, 1645, 1605, 1580 cm^{-1} に吸収を示す。またその 1H -NMR スペクトルは δ 0.97 (6H, d, $J=2.8Hz$), 1.50~2.00 (3H, m), 2.45 (2H, t, $J=3.6Hz$) の 3-methylbutyl 基のシグナルのほか δ 6.97~8.65 にベンゼン環上の隣接した 4 個のプロトンのシグナル, δ 10.35 に水酸基プロトン, δ 11.07 にアミノ基プロトンのシグナルを示す。**64** は加水分解により anthranilic acid を与えたので、その構造は *N*-(4-methylvaloroyl) anthranilic acid であることが明らかになった。一方、**62** をアルカリ性で H_2O_2 酸化したところ既述の **17** と組成 $C_{14}H_{15}NO_2$, mp 173~174°C の **65** とが得られた。**65** の UV スペクトルは 217, 258, 288 nm に 2,3 置換インドール核の特徴的な吸収を示し、IR スペクトルは 3360, 1650 cm^{-1} に吸収を示す。また、 1H -NMR スペクトルは δ 1.76 (6H, s), 3.96 (2H, d, $J=6.8Hz$), 5.45 (1H, t, $J=6.8Hz$) に 3-methyl-2-butenyl 基のシグナル, δ 7.04~8.33 に隣接した 4 個の芳香族プロトンのシグナル, δ 10.60 にインドール核 NH プロトンのシグナルを示す。以上のスペクトルデータと **64** の構造とから **65** は 2-(3-methyl-2-butenyl) indole-3-carboxylic acid であると推定される。

従って **10** の窒素置換イソプレン側鎖は **62** ではインドール核の 2 位に転位しており、後者の構造は 3-[2-(3-methyl-2-butenyl) indol-3-yl]-6-(indol-3-yl)-2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone であることが明らかになった。

62 は同様にして AQ-A-1 (**4**) から 5% の収率で得られた。またその脱メチル体である asterriquinone (**1**) を室温で氷酢酸中 HCl で処理したところ窒素置換イソプレン鎖の転位反応が主として進行し組成 $C_{32}H_{30}N_2O_4$, mp 164~165°C の mono-転位体 (**66**) と組成 $C_{32}H_{30}N_2O_4$, mp 196~199°C の di-転位体 (**48**) とが各々 36% と 30% の収率で得られた。また脱離反応も若干起こり demethyl AQ-

B-3 (55) と demethyl AQ-D (59) が僅かであるが単離された。

Casnati ら¹⁵⁾や Inada ら¹⁶⁾は、酸触媒下での Claisen 転位により 3-methyl-1-(1,1-dimethyl-2-propenyl) indole の窒素置換イソプレン鎖が 2 位に転位した化合物を得ているが、今回 asterriquinone 類においても同様なイソプレン鎖の転位が観察されたわけである。

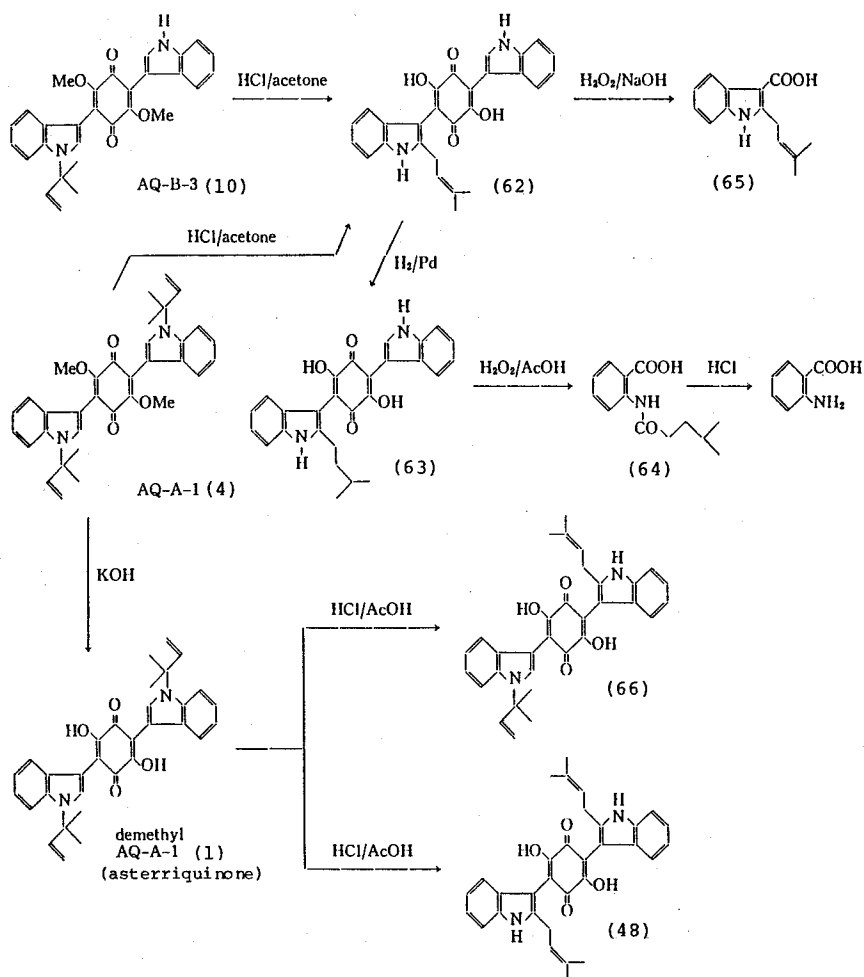


Chart 18

4) イソプレン側鎖の水和

インドール核の 7 位に置換した 3-methyl-2-butenyl 基においては水和反応

を観察した。

例えば、AQ-B-1 (8) を氷酢酸中HCl とともに加熱還流したところ組成 $C_{32}H_{32}N_2O_5$, mp 206~208°C の **67** が得られた。**67** のマスペクトルは m/z 524 に分子イオンピーク, さらに m/z 506 に H_2O が脱離したフラグメントピークを示す。また, 1H -NMR スペクトルでは 1,1-dimethyl-2-propenyl 基に起因するシグナルは認められるが, 3-methyl-2-butenyl 基に起因するシグナルは消失し, 代って δ 1.30 に gem. dimethyl 基のプロトンと δ 1.90 と δ 3.10 に A_2B_2 タイプの 4 個のプロトンのシグナルが観察される。このほか, δ 6.70~7.50 に 8 個の芳香族プロトン, δ 9.00 に 2 個の水酸基のプロトン, δ 9.83 と δ 10.33 に 2 個のインドール核 NH プロトンのシグナルが認められる。従って **67** は AQ-B-1 (10) の 3-methyl-2-butenyl 基が, 3-methyl-3-hydroxybutyl 基に変化した物質であると推定した。

同様にして AQ-B-2 (9) と AQ-C-2 (13) からそれぞれ組成 $C_{32}H_{32}N_2O_5$, mp 236~238°C の **69** と組成 $C_{27}H_{26}N_2O_5$, mp 251~252°C の **68** が, 水和化合物として得られた。

5) イソプレン側鎖の環化

インドール核の 7 位に置換する 3-methyl-2-butenyl 基とインドール核窒素の間で六員環が形成されることを観察した。

AQ-B-1 (8) を氷酢酸中HCl で処理した際, 水和化合物 (**67**) の他, 組成 $C_{32}H_{30}N_2O_4$, mp 242~243°C の **70** が収率 10 % で得られた。**70** の 1H -NMR スペクトルを **8** のそれと比較すると 3-methyl-2-butenyl 基に起因するシグナルが認められず, 代って δ 1.47 に gem. dimethyl 基のシグナルおよび δ 2.03 と δ 3.00 にメチレンプロトンのシグナルが各々トリプレット ($J=6$ Hz) としてあらわれている。その他, インドール核 NH プロトンのシグナルも δ 8.47 に 1 個認められるのみである。従って **70** は 3-methyl-2-propenyl 基がインドール核窒素との間で六員環を形成した化合物であると推定した。

AQ-C-2 (13) も同様な反応に際し組成 $C_{27}H_{22}N_2O_4$, mp 259~261°C の環形成化合物 (**71**) を与えたが, AQ-B-2 (9) は環形成化合物を与えなかった。これは同じインドール核の 2 位に置換するイソプレン側鎖による立体障害のためイン

ドール核窒素との環化が起こり得なかったものと説明できよう。

ベンゼン環に置換する 3-methyl-2-butenyl 基が *ortho* 位の水酸基と環化することはよく知られているが、インドール核の 7 位のイソプレン鎖と N-1 位との環化反応は今回初めて観察されたものである。

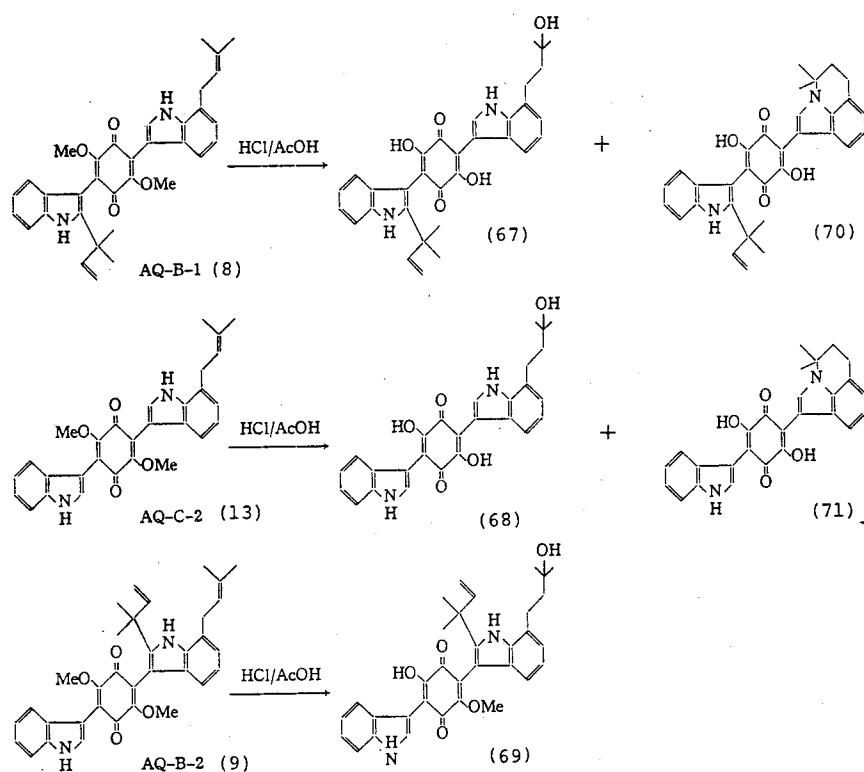


Chart 19

本節で述べた諸反応によって得られた脱メチル体、側鎖の脱離や転位、閉環によって生じた各化合物の抗腫瘍活性については山本らにより別途に調査が行なわれた。¹³⁾

第 4 節 Asterriquinone 類の生合成について

山本らは [3-¹⁴C] tryptophan の取り込み実験により asterriquinone (1) が indolepyruvic acid 2 分子の C-1 位と C-3' 位, C-1' 位と C-3 位間の 2 ケ所

における縮合により生合成されることを明らかにしている²⁾。このような形式の縮合は terphenyl benzoquinone やその開環誘導体の pulvinone などの生合成においても知られているが、この縮合過程を酵素レベルで検討した例はない。今回、著者は *A. terreus* (var. *africanus* IFO 8835 株) をもちい indolepyruvic acid の縮合に関与する酵素について検討した。

粗酵素の調整は次のようにして行った。培養開始後 6 日から 7 日目の菌体を海砂, polyvinylpolypyrrolidone (PVP) および phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) とともにトリス緩衝液 (pH 7.0 ; 10mM MgCl_2 , 2-mercaptoethanol および 10% グリセリンを含む) と混合し、乳鉢中で磨碎し、ホモジネートを 1×10^4 g で遠心分離し、上清の 30~55% 飽和硫酸分画を集めた。この沈殿を少量のトリス緩衝液に溶解し、Sephadex G-25 に通して精製、たんぱく質部分を集めこれを粗酵素とした。

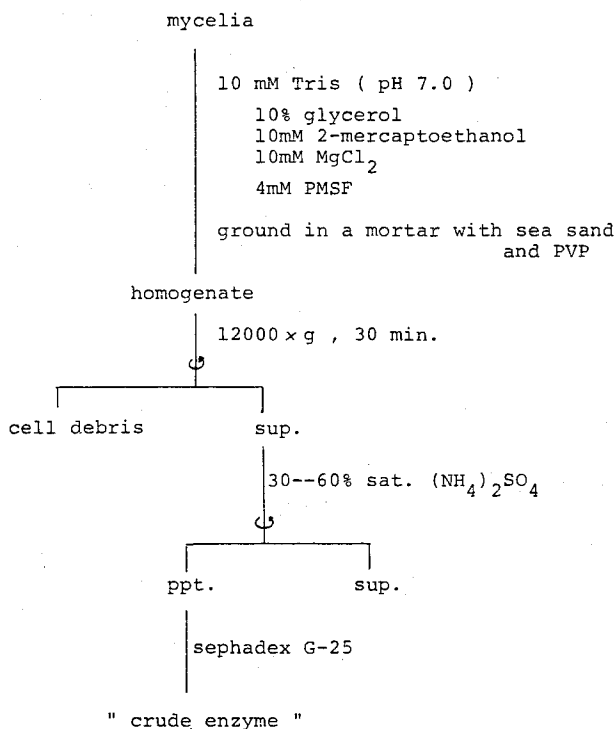


Chart 20

[1-¹⁴C] Indolepyruvic acid を cofactor の ATP, Mg^{2+} 存在下, 上記粗酵素と

インキュベートした後エーテル抽出し、抽出液を CH_2N_2 で処理後 ^{14}C 標識化合物をシリカゲル TLC で分離し、その位置を UV ランプ下またはラジオクロマトグラムスキャナーによって検出した。その際 Fig. 3 の上図に示すように AQ-D (14) と同じ R_f 値を持つ酵素生成物が認められた。しかしこの生成物は失活させた粗酵素を用いて反応を行った場合 (Fig. 3 の下図) は認められなかった。反応生成物の構造を明らかにするため、エーテル抽出部を CH_2N_2 で処理せずに蓚酸処理シリカゲル上の TLC で分離し放射活性を持ちしかも赤紫色を呈する分画を抽出し MeOH から再結晶して $\text{mp} > 300^\circ\text{C}$ の暗紫色針状晶を得た。本化合物の IR スペクトルおよび TLC 上の挙動は demethyl AQ-D (59) のそれと一致した。従って酵素反応生成物は demethyl AQ-D (3,6-bis(indol-3-yl)-2,5-dihydroxy-1,4-benzo-

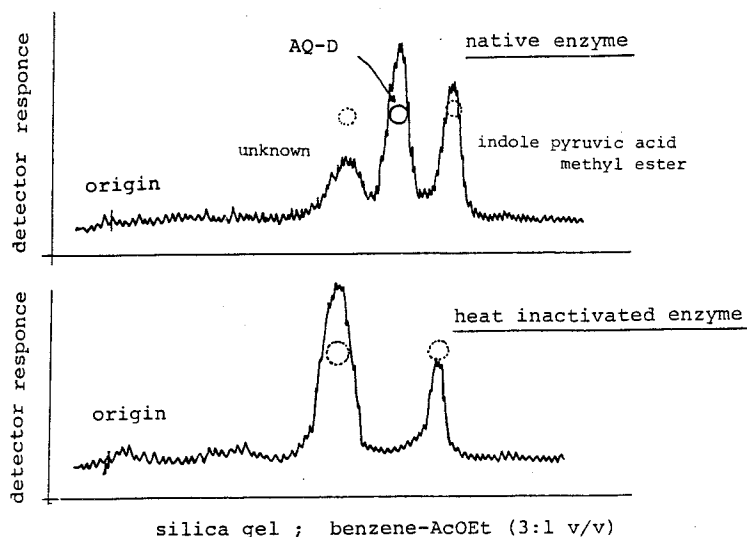


Fig.3

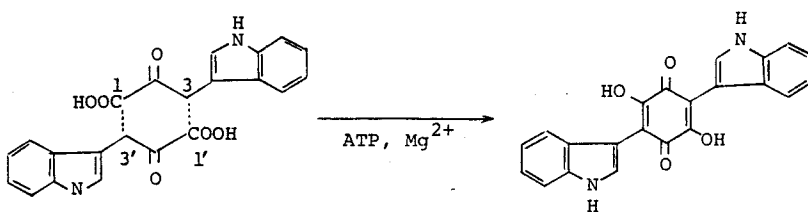


Chart 21*

*) $[^{14}\text{C}]$ Indolepyruvic acid methylester も本酵素により demethyl AQ-D に変化する。

quinone)であると推定した。

次にこの酵素を DEAE-Sephadex A-50, hydroxyapatite, Sephadex G-200 などのカラムクロマトグラフィーによって精製することを試みたが、酵素が不安定であるためこの試みは失敗した。

しかし以上の結果より asterriquinone 類の生成にあたっては、まず indolyl benzoquinone 骨格が形成されたあとインドール核にプレニル基が導入されることが充分理解された。次にこのプレニル化の機構について得られた若干の知見について述べる。

まず asterriquinone 類の生合成における相互関係を調べるため IFO 8835 株を用い培養日数と asterriquinone 類の生成量との関係 (Fig. 4) および $[3-^{14}\text{C}]$ tryptophan の asterriquinone 類への取り込み (Table 5) を調べた。Fig. 4 から AQ-D が最初に生成しその後プレニル基が段階的に導入される様子がよくわかる。また $[3-^{14}\text{C}]$ tryptophan の投与実験で得られた各色素の比放射活性の比較からもこのことは理解された。 $[3-^{14}\text{C}]$ tryptophan 投与実験で asterriquinone 類以外の化合物 (77)~(80) にも ^{14}C の分布が観察されたが、これらの代謝産物については第 2 章、第 3 節で述べる。

次に asterriquinone 類の相互変換の様子を調べるため成長中の細胞を用い、 ^{14}C 標識した asterriquinone 類の取り込み実験を行ったが、asterriquinone 類が水に難溶であるためか、あるいは膜透過性が悪いためか放射能の相互移行は観察されなかった。そこで次に無細胞系を用いて検討することにした。

粗プレニル化酵素の調製は縮合活性を検討した際用いた方法を一部変え、30~75% 飽和の硫酸分画を用い、トリス緩衝液は pH 7.5 のものを用いて行った。各種 asterriquinone 類と dimethylallylpyrophosphate とを cofactor の Mg^{2+} 存在下、粗酵素とともにインキュベートしプレニル化反応を進行させた。ついで反応液をエーテル抽出し、抽出部をさらにシリカゲル TLC で分離して得た各反応産物を各 asterriquinone の標品と R_f 値の比較により同定した。

この反応においてキノンの水酸基が遊離した型の脱メチル体はプレニル化されず、メトキシ体のみがプレニル化されることが分った。

以上の結果より本株では最初に生成する demethyl AQ-D がメチル化された後、順次プレニル化が進行するものと考えられる。

($\mu\text{M}/2 \text{ L culture}$)

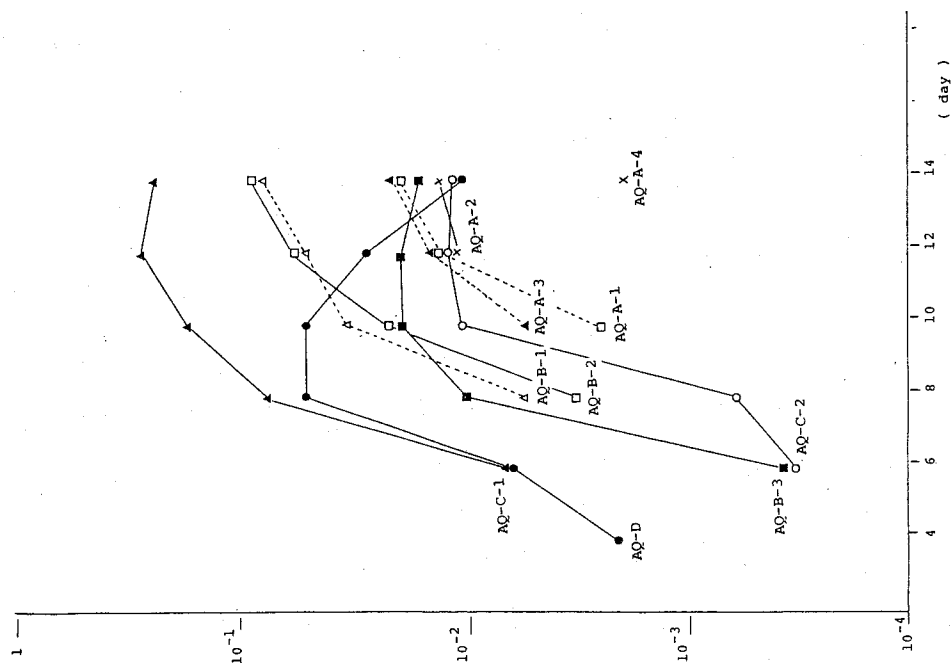


Fig. 4

Compounds	total radio- activity X10 ⁵ dpm	incorpora- tion ratio %	specific radio- activity X10 ⁷ dpm/mM	amount mg
AQ-A-1 (4)	0.84	0.07	1.14	4
AQ-A-2 (5)	1.10	0.11	1.44	5
AQ-A-3 (6)	1.12	0.11	1.42	4
AQ-A-4 (7)	9.45	0.81	1.67	4
AQ-B-1 (8)	15.8	1.35	1.71	49
AQ-B-2 (9)	19.5	1.67	1.66	63
AQ-B-3 (10)	7.50	0.64	1.66	21
AQ-B-4 (11)	4.02	0.34	1.79	12
AQ-C-1 (12)	65.8	5.62	2.17	140
AQ-C-2 (13)	2.80	0.24	2.38	6
AQ-D (14)	27.0	2.31	5.73	19
(77)	57.6	4.92	2.50	99
(78)	7.79	0.66	2.49	13
(79)	36.4	3.11	1.26	13
(80)	-	-	0.0181	-

Table 5

AQ-B-1 (8), AQ-B-2 (9), AQ-B-3 (10), AQ-C-1 (12), AQ-C-2 (13), AQ-D (14) をプレニル化の基質とした時に生成した化合物を Table 6 に示す。

Substrate	Prenylated Products
AQ-D	C-1, C-2, B-3
C-1	B-1, B-2, A-3
C-2	B-1, A-2, A-4
B-3	A-1, A-3
B-1	A-2, A-4
B-2	-

Table 6

この結果からインドール核の N-1 位, C-2 位, C-7 位に対するプレニル化は平行的にしかも段階的に進行することが示唆された。

インドール核のプレニル化については, R.M. McGrath らの cyclopiazonic acid の 4 位プレニル化酵素の研究¹⁷⁾や C.M. Allen の echinulin の 2 位プレニル化酵素の研究¹⁸⁾があるがその機構はまだ十分判ったとはいえない。また, インドール核の 2 位に 1,1-dimethyl-2-propenyl 基 (reversed prenyl 基) が導入される機構について G. Casnati らは窒素に置換した 3-methyl-2-butenyl 基の Claisen 転位によると推定している¹⁵⁾。しかし asterriquinone 類の場合, 酵素実験でプレニル基の転位は観察されず, また AQ-A-1 (4) や AQ-B-3 (11) の酸触媒による反応でもプレニル基の転位した AQ-A-3 (6) や AQ-C-1 (12) を得ることはできなかった。従って asterriquinone 類では, 2 位のプレニル化は窒素原子からの転位によるのではなく直接置換によるものと考えられる。

以上の結果より asterriquinone 類の生合成経路は Chart 22 に示すように推定される。

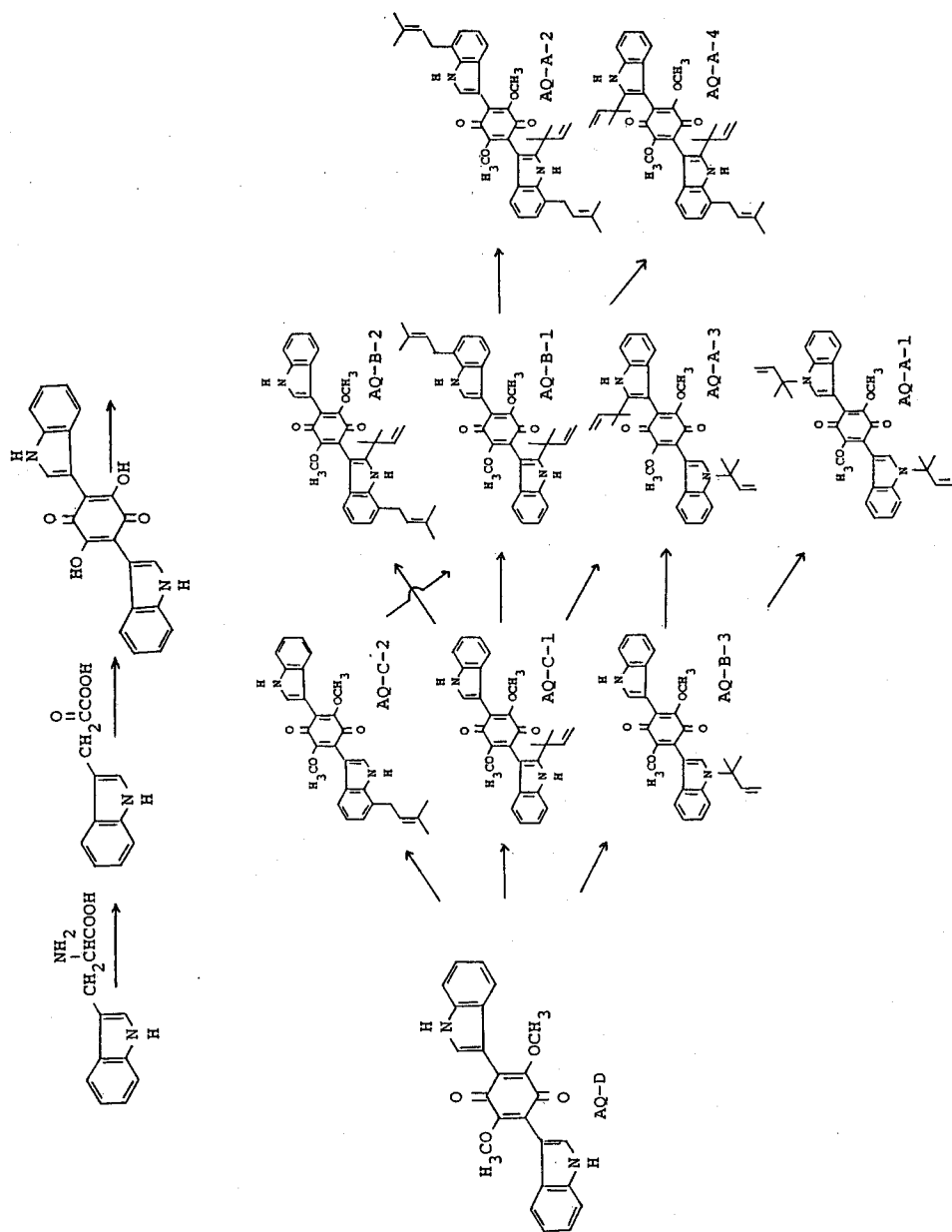


Chart 22

第2章 Asterriquinol 誘導体その他の tryptophan 関連代謝産物

Asterriquinone 類の抗腫瘍活性を検討する際、多量の試料が必要となり、*A. terreus* var. *africanus* IFO 8835 株の大量培養を行ったので、asterriquinone 以外の含量の少ない代謝産物も多数単離され検討の対象となった。これらはいずれも無色の化合物で、asterriquinone 類のキノンが還元されたキノール類およびそのエーテル計 8 種と 1 種の tripeptide 様化合物である（第1節）。

一方、asterriquinone (1) の生産量の増大をはかるため 1 の生産株である *A. terreus* IFO 6123 株の培養条件を検討中、tryptophan を含む Czapek-Dox 培地で振盪培養すると 1 は生成せず代って astechrome と命名された tryptophan と alanine 由来の 2,5-dioxopiperazine 誘導体の鉄錯体が生成することがわかった（第2節）。

以上の代謝産物はいずれも tryptophan に関係した化合物であるので tryptophan 関連代謝産物として本章にまとめた。

第1節 *A. terreus* var. *africanus* IFO 8835 株から単離した asterriquinol 類縁代謝産物と tripeptide 様代謝産物について

a) 代謝産物の単離

A. terreus var. *africanus* IFO 8835 株の菌体のエーテル抽出物から紫色色素の asterriquinone 類のほか asterriquinol およびそのエーテル型誘導体 8 種（代謝産物 I～Ⅷ）と 1 種類の tripeptide 様代謝産物（代謝産物 IX）を単離した。

これらの代謝産物は asterriquinone 類のクロマトグラフィーによる分離の過程で asterriquinone 類とともに溶出される。AQ-ol-I (72) は、AQ-A-1 (4) と同じ分画に溶出する。72 は AQ-A-1 (4) より MeOH に難溶なのでこの画分を MeOH で分別再結晶することにより組成 $C_{34}H_{36}N_2O_4$, mp 242~245°C の無色針状晶として得られた。AQ-ol-II (73) は AQ-C-1 (12) とともに溶出し AQ-C-1 (12) よりベンゼンに難溶なのでベンゼンで分別再結晶し組成 $C_{29}H_{28}N_2O_4$, mp 206

～208°Cの無色針状晶として得られた。代謝産物Ⅲ(74)はAQ-A-1(4)とAQ-A-2(5)の間に溶出し、MeOHより組成 $C_{36}H_{40}N_2O_4$ 、mp 158～159°Cの無色プリズム晶として得られた。代謝産物Ⅳ(75)はAQ-A-3(6)とAQ-A-4(7)の間に溶出しMeOHより組成 $C_{31}H_{32}N_2O_4$ 、mp 202～204°Cの無色プリズム晶として得られた。代謝産物Ⅴ(76)はAQ-B-3(10)とAQ-B-4(11)の間に溶出しMeOHより組成 $C_{31}H_{32}N_2O_4$ 、mp 226～228°Cの無色針状晶として得られた。

代謝産物Ⅵ～Ⅷと tripeptide 様代謝産物Ⅸは asterriquinone 類が溶出した後、酢酸エチル濃度 30 % から 50 % で溶出する分画に存在した。30 % 酢酸エチル濃度で溶出する淡黄色の分画を再びシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ベンゼンと酢酸エチルの 8 : 2 の混合溶媒で展開したところ、第 1 分画からは mp 134～138°C の代謝産物Ⅵ(77)が、第 2 分画からは mp 131～140°C (not sharp) の代謝産物Ⅶ(78)が得られた。一方、最初のクロマトグラフィーの 50 % 酢酸エチルで溶出する画分には代謝産物Ⅷと代謝産物Ⅸが含まれていた。この画分を MeOH で分別再結晶したところ難溶部より mp 221～223°C の代謝産物Ⅷ(79)が得られた。その母液をアルミナカラムクロマトグラフィーに付しベンゼンと酢酸エチルの 9 : 1 の混合溶媒で溶出したところ最初の分画からは、mp 221～223°C の tripeptide 様代謝産物Ⅸ(80)が、第 2 分画から代謝産物Ⅷ(79)が単離された。

b) Asterriquinol 誘導体の構造

AQ-ol-I (72) と AQ-ol-II (73) は空気酸化で徐々に赤紫色のキノン体となり、またこの変化は $FeCl_3$ 酸化では急速に起った。この酸化反応で生じたキノン体は各々 AQ-A-1 (4) と AQ-C-1 (12) である。一方、この 2 種のキノンを $Na_2S_2O_4$ で還元したところ 72 と 73 が復生した。従って AQ-ol-I (72) は AQ-A-1 (4) のキノール体、AQ-ol-II (73) は AQ-C-1 (12) のキノール体であることが明らかになった。

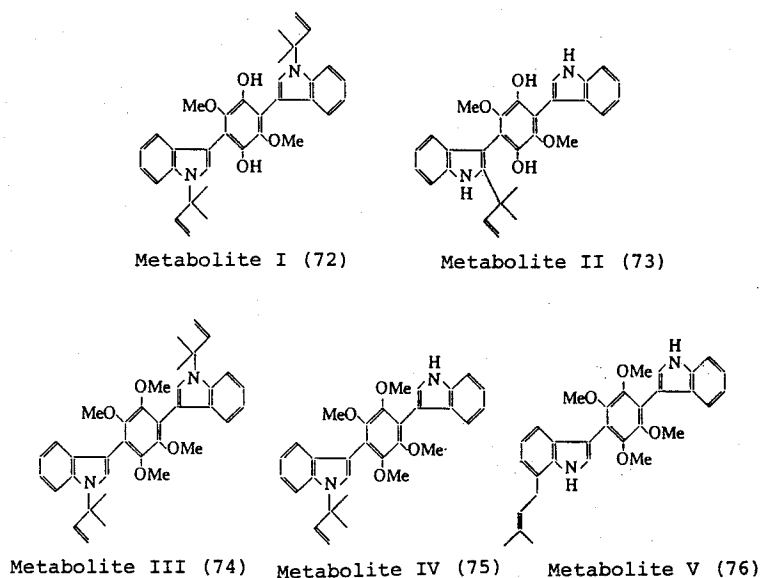
72 と 73 の菌体からの収量は抽出分離操作を速に行うと増加する。また、菌体エーテル抽出物は抽出直後は黄褐色であるが、抽出分離操作の過程で赤褐色に変化することなどを考え合せると、単離した asterriquinone 類の少なくとも一部は菌体内でキノール体として存在しているものと考えられる。

代謝産物Ⅲ(74)、代謝産物Ⅳ(75)、代謝産物Ⅴ(76)はいずれもエールリッヒ

反応陽性（赤紫色）で， ^1H -NMR スペクトルでは 4 個のメトキシ基のシグナルを示す同一タイプの化合物である（Table 7）。それぞれ AQ-A-1 (4)，AQ-B-3 (10)，AQ-C-2 (13) に対応するキノールの dimethyl ether 体と推定された。実際，AQ-A-1 (4)，AQ-B-3 (10)，AQ-C-2 (13) を $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ で還元しキノール体に誘導後， CH_2N_2 でメチル化して得た dimethyl ether 体は各々 74, 75, 76 と比較同定された。

Compounds	Formula	mp °C	^1H -NMR (δ ; CDCl_3)
Metabolite III (74)	$\text{C}_{36}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_4$	158--159	1.82(s, 12H), 5.12(dd, J=17.5, 1Hz, 1H), 5.18(dd, J=10, 1Hz, 1H), 6.20(dd, J=17.5, 10Hz, 1H), 3.49(s, 12H), 6.93--7.80(m, 10H)
Metabolite IV (75)	$\text{C}_{31}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_4$	202--204	1.82(s, 6H), 5.12(dd, J=17.5, 1.5Hz, 1H), 5.20(dd, J=10, 1.5Hz, 1H), 6.22(dd, J=17.5, 1.5Hz, 1H), 3.50(s, 12H), 6.93--7.76(m, 10H), 8.23(bs, 1H)
Metabolite V (76)	$\text{C}_{31}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_4$	226--228	1.80(s, 6H), 3.63(d, J=6.5Hz, 2H), 5.47(t, J=6.5Hz, 1H), 3.50(s, 6H), 3.53(s, 6H), 6.83--7.83(m, 9H), 8.32(bs, 2H)

Table 7



代謝産物 VI (77) は組成 $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5$ ， $[\alpha]_D^{18} + 34.3^\circ$ (EtOH) の光学活性体である。IR スペクトルは 3400 cm^{-1} に水酸基の吸収を示すが，1N NaOH には不溶で CH_2N_2 で処理してもメチル化されない。 ^1H -NMR スペクトルは δ 3.31, 3.52,

4.08に3個のメトキシ基, δ 5.30に水酸基, δ 6.68~7.78に9個の芳香族プロトン, δ 10.34に1個のインドール核NHプロトンのシグナルを示している。その他 δ 6.45に他の1個のインドール核NHプロトンのシグナル, δ 6.20にそれとカップリングするメチンプロトンのシグナルが観察される。これは2個のインドール核のうち1個の2位が何等かの変化をうけていることを示唆する。**77**を LiAlH_4 で処理したところ組成 $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4$, mp 285~288°Cの**81**が得られた。**81**は光学不活性で1N NaOHに可溶である。 ^1H -NMRではメチンプロトンとアルコール性水酸基のシグナルが消失し代って各1個の芳香族プロトンとフェノール性水酸基のシグナルが新生している。これを CH_2N_2 で処理したところ組成 $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_6$, mp > 300°Cの methyl ether 体 (**82**) が得られた。**82**は ^1H -NMR スペクトルにおいて δ 3.44に2個のメトキシ基, δ 6.80~7.40に5個の芳香族プロトン, δ 11.27に1個のインドール核NHプロトンのシグナルを示し, **77**, **81**に比しそのプロトン数は一見半減する。このことは**82**の ^{13}C -NMR スペクトルにおいても観察されるがいずれも**82**が対称構造をもつことを示すものである。そこでAQ-D(**14**)を $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ で還元後 CH_2N_2 で処理して得た dimethyl ether 体と**82**を比較したところ完全に一致した。従って**77**はAQ-D(**14**)と同じ骨格を持ちしかも2個のインドール核のうち1個が3-hydroxyindoline 構造に変化した物質であると推定した。**77**をピリジンと無水酢酸でアセチル化したところ組成 $\text{C}_{29}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_7$, mp 227~228°Cの**83**が得られた。IRスペクトルは 1728 cm^{-1} にアルコール性 $-\text{OCOCH}_3$ 基, 1670 cm^{-1} に $-\text{NCOCH}_3$ 基のカルボニル吸収を示す。 ^1H -NMR スペクトルでは,**77**にみられた水酸基およびアミノ基プロトンのシグナルが消失し, 代って2個のアセチル基のシグナルが観察される。またアミノ基とカップリングしていたメチンプロトンのシグナルも δ 7.28にシングレットとして観察される。従って,**83**は**77**の3-hydroxyindoline 部分の水酸基とアミノ基がアセチル化された物質であると推定された。また**83**の ^{13}C -NMR スペクトルではメチン炭素のシグナルが δ 98.9に $J=181\text{ Hz}$ のダブルットとしてあらわれていることから, それがインドリンの窒素とフェノール性水酸基とに挟まれていることがわかる。**77**を $p\text{-TsCl}$ で処理したところ組成 $\text{C}_{25}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4$, mp 272~274°Cの脱水体(**84**)が得られた。**84**は光学不活性で, ^1H -NMR スペクトルでは,**77**にみられたメチンプロトンおよび水酸基プロトンのシグナルが消失し, さらにアミノ基のシグナ

ルが δ 11.19 の低磁場に認められる。従って **84** は **77** の 3-hydroxyindoline 部分分の 2 位と 3 位の間の脱水体と推定された。

以上の結果より代謝産物 **Ⅶ** (**77**) の平面構造は 5a,b-dihydro-3-(indol-3-yl)-1,2,4-trimethoxy-10bH-benzofuro[2,3-b]indole-10b-ol であることが明らかとなった。

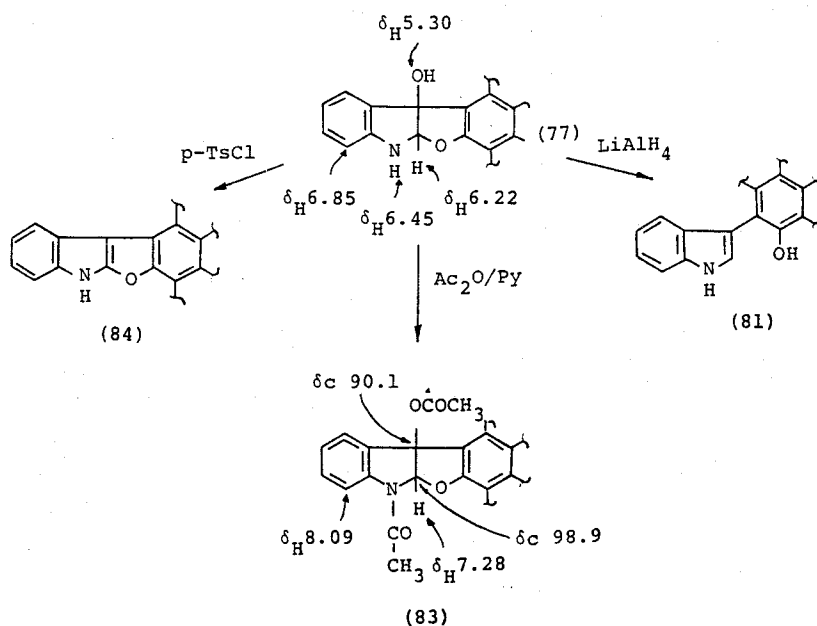


Chart 23

代謝産物 **Ⅶ** (**78**) は組成 $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_5$, $[\alpha]_D^{21} + 51.2^\circ$ (dioxane) の光学活性体である。IR, UV および ^1H -NMR スペクトルは代謝産物 **Ⅵ** (**77**) のそれと酷似しているが 1N NaOH に可溶で, ^1H -NMR スペクトルではメトキシ基のシグナルは 2 個しか認められず, 代って δ 6.50 にフェノール性水酸基のシグナルを示している。従って, **78** は **77** の mono-demethyl 体と推定された。事実, **78** を CH_2N_2 で処理したところ **77** ($[\alpha]_D^{19} + 29.8^\circ$) が得られた。さらに **78** を LiAlH_4 で処理したところ AQ-D quinol (**85**) と AQ-D (**14**) が得られたので, 2 個のメトキシ基は互いにベンゼン環の *para* 位に置換していることが明らかになった。

従って代謝産物 **Ⅶ** (**78**) は 5a,b-dihydro-3-(indol-3-yl)-1,4-dimethoxy-10bH-benzofuro[2,3-b]indole-2,10b-diol であることが明らかになった。

代謝産物Ⅷ(79)は組成 $C_{24}H_{20}N_2O_6$, $[\alpha]_D^{19} + 39^\circ$ (dioxane) の光学活性体である。79は 1N NaOH に不溶で UV スペクトルは 214, 237(sh), 305, 320(sh) nm にインドリン核に特徴的な吸収帯を示す。¹⁹⁾ 1H -NMR および ^{13}C -NMR スペクトル (Table 8) のシグナル数は他の asterriquinol 類の半数で対称構造の存在を示唆する。またそれらの chemical shift 値は代謝産物Ⅵ(77), Ⅶ(78)において認められた 3-hydroxyindoline 構造部に由来する値と一致する。79を $LiAlH_4$ で処理したところ, 78の場合と同様に AQ-D (14) と AQ-D quinol (85)とが得られた。

従って代謝産物Ⅷ(79)は 5, 5a, 12, 12a-tetrahydro-7, 14-dimethoxy-benzo [1'', 2'': 4, 5; 4'', 5'': 4', 5'] difuro [2, 3-b: 2', 3'-b'] diindole-7b, 14b-diol であることが明らかになった。

Position	^{13}C -NMR	1H -NMR
1	124.9 (d)	7.62 (dd, J=7.5, 1.5 Hz)
2	117.7 (d)	6.63 (ddd, J=7.5, 7.5, 1.0 Hz)
3	128.8 (d)	6.98 (ddd, J=9.0, 7.5, 1.5 Hz)
4	108.4 (d)	6.54 (dd, J=9.0, 1.0 Hz)
1a	129.9 (s)	-
4a	135.5 (s)	-
5	-	6.33 (d, J=3.5 Hz)
5a	105.4 (d)	6.13 (d, J=3.5 Hz)
7b	88.2 (s)	-
7	149.2 (s)	-
6a	124.1 (s)	-
7a	144.7 (s)	-
OCH ₃	59.8 (q)	3.98 (s)
OH	-	5.17 (s)

(δ ; in $CDCl_3$)

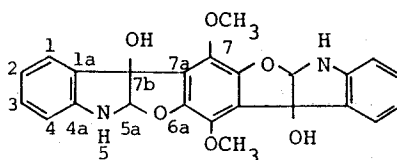


Table 8

Chart 24 に代謝産物 VI(77), VII(78), VIII(79) の諸反応と反応生成物を示した。

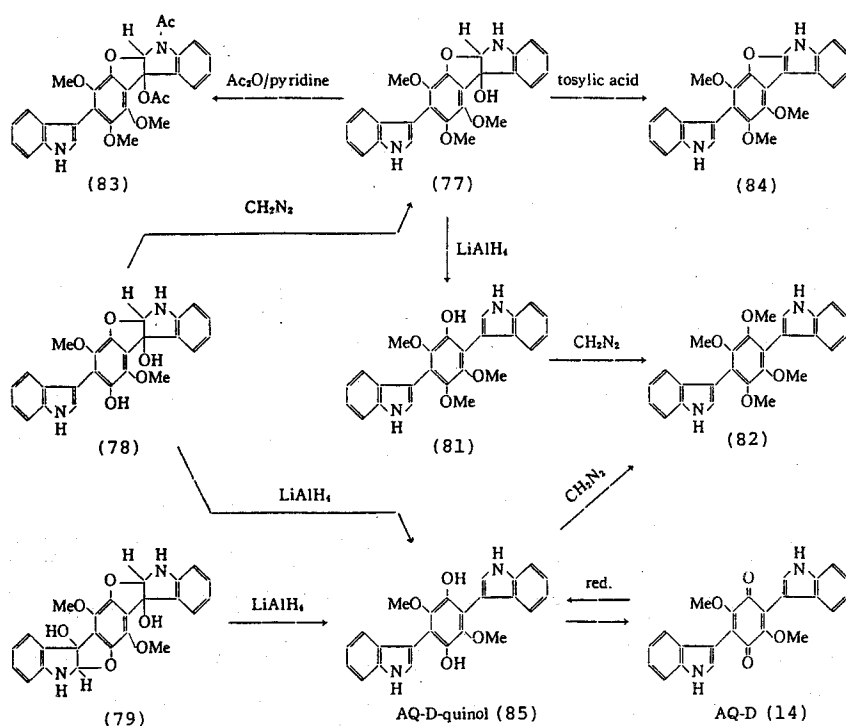
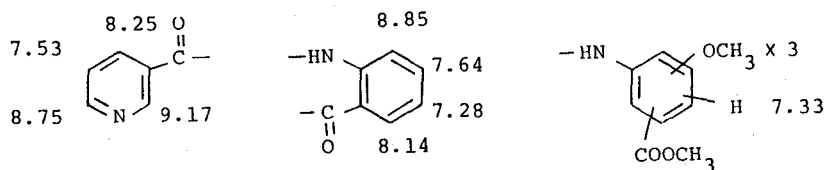


Chart 24

c) Tripeptide 様代謝産物の構造

代謝産物 IX(80) は組成 $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_7$, 光学不活性の無色針状晶である。IR スペクトルは 3250 cm^{-1} にアミノ基, 1710 , 1675 , 1635 cm^{-1} に 1 個のエステルと 2 個のアミド結合のカルボニル吸収を示す。 ^1H -NMR スペクトルは δ 3.75, 3.89, 3.92, 3.94 に 4 個のメトキシ基のプロトン, δ 7.33~9.17 に 9 個の芳香族プロトン, δ 9.55 と δ 12.40 に 2 個のアミノ基プロトンのシグナルを示す。9 個の芳香族プロトンは chemical shift 値とシグナルの分裂様式および spin-decoupling 実験の結果から 3 個の部分に分けられた。第一の部分は 3 位にカルボニル基を持つピリジン環の 4 個のプロトン, 第二の部分は *ortho* 置換ベンゼン環の 4 個のプロトン, 第三の部分は 5 置換ベンゼン環の芳香族プロトンである (Fig.5)。

以上のスペクトルデータより 80 は 3 個の芳香族部分がアミド結合した tripeptide 様化合物であると推定された。



(δ ; acetone- d_6)

Fig. 5

80 は冷時 1N NaOH に不溶であるが、数分間加温すると組成 $C_{23}H_{21}N_3O_7$, mp 227~228°C の酸性物質 (**86**) に変化する。**86** の 1H -NMR スペクトルでは 1 個のメトキシ基のシグナルが消失しており、IR スペクトルでは 1710 cm^{-1} の吸収が消失し代って 1670 cm^{-1} にカルボキシ基の吸収が新生している。従って **86** は **80** のメチルエステルが脱メチル化されたものと推定される。**80** を 1N NaOH 中 1 時間 100°C で加熱したところ組成 $C_{17}H_{18}N_2O_6$, mp $178\sim 180^\circ\text{C}$ の酸性物質 (**87**) とニコチン酸 (mp 272°C の塩酸塩、標品と IR で同定) が得られた。**87** の 1H -NMR スペクトルは δ 3.77, 3.83, 3.93 に 3 個のメトキシ基, δ 6.67~7.67 に 5 個の芳香族プロトン, δ 6.75 と δ 7.83 に各アミノ基とカルボン酸のプロトンのシグナルを示し、この物質が dipeptide 様化合物であることを示唆した。また 5 個の芳香族プロトンのうち 4 個の chemical shift 値は **80** の場合に比較して高磁場にシフトしている。**87** をさらに 2.5N NaOH 中 4 時間加熱還流したところ, mp $144\sim 145^\circ\text{C}$ の anthranilic acid と組成 $C_{10}H_{13}NO_5$, mp $141\sim 142^\circ\text{C}$ の **88** とが得られた。**88** の 1H -NMR スペクトルは, δ 3.90 に 3 個のメトキシ基, δ 7.10 に 1 個の芳香族プロトン, δ 7.83 にアミノ基と水酸基による 3 個のプロトンのシグナルを示す。また IR スペクトルは 1668 cm^{-1} にカルボニル吸収 (*m*-aminobezoic acid は 1635 cm^{-1}), UV スペクトルは 250 nm に吸収極大 (*p*-aminobezoic acid は 280 nm) を示す。このスペクトルデータより **88** は 3,4,5-trimethoxy-anthranilic acid であると推定されたがその融点は文献値²⁰⁾ (mp $136\sim 137^\circ\text{C}$) と一致しなかったため、文献記載の方法で gallic acid を原料として 3,4,5-trimethoxyanthranilic acid を合成し **88** と比較したところ一致した。

以上の結果より **80** は nicotinic acid, anthranilic acid および 3,4,5-trimethoxy-anthranilic acid methylester からなることが明らかになった。この 3 個の化合

物の結合順序は 80 のマスペクトルが m/z 465 に分子イオンピークを m/z 224 に 3,4,5-trimethoxyanthranilic acid methylester が脱離したフラグメントピークを, また m/z 241 に 3,4,5-trimethoxyanthranilic acid methylester のフラグメントピークを示すことから推定されたが, 最終的には合成により決定された。即ち, 3,4,5-trimethoxyanthranilic acid methylester (89) に *o*-nitrobenzoyl chloride を作用して得られる *N*-(*o*-nitrobenzoyl)-3,4,5-trimethoxyanthranilic acid methylester (90) を Pd-C 上で接触還元して *N*-(*o*-aminobenzoyl)-3,4,5-trimethoxyanthranilic acid methylester (91) に誘導し, さらにこれに nicotinyl chloride を作用させて methyl-3,4,5-trimethoxy-2-[[2-[(3-pyridinyl carbonyl) amino] benzoyl] amino] benzoate を得た。本物質は代謝産物 IX (80) と比較したところ完全に一致した。

上記の代謝産物 IX (80) の諸反応とその合成経路を Chart 25 に示す。

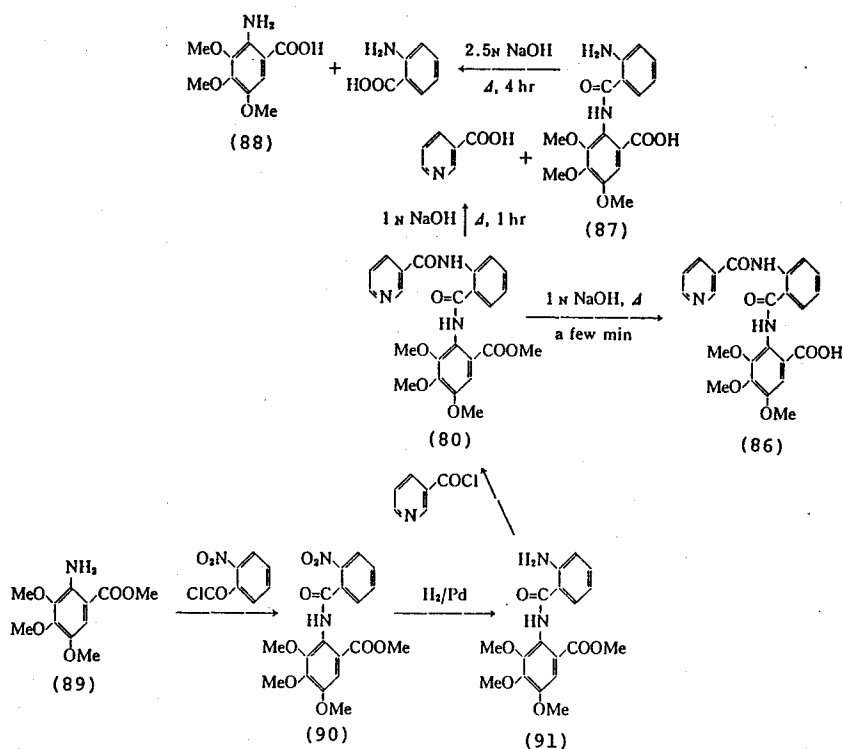


Chart 25

上記のように無色代謝産物 I~VIII (72~79) はいずれも asterriquinol 誘導体で

あるが代謝産物 VI~VIII (77~79) は AQ-D quinol (85) のインドール核の 2, 3 位が酸化されて epoxide ができ, さらにキノール核の水酸基が反応して生成したものと考えられる。

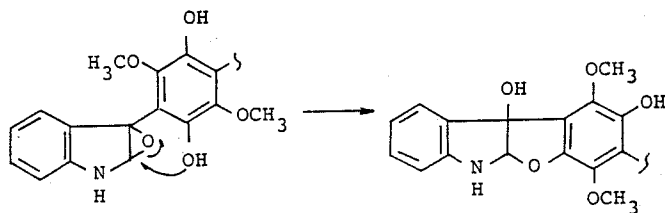


Chart 26

新規な tripeptide 様の代謝産物 IX (80) を構成する nicotinic acid および anthranilic acid はいずれも tryptophan 関連の化合物であるのでこの物質も tryptophan 関連の代謝産物として述べた。

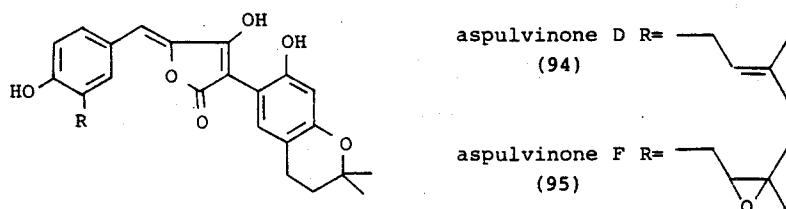
第 2 節 *A. terreus* IFO 6123 株より単離された代謝産物 astechrome について

a) Astechrome の単離

Astechrome (92) は静置培養ではほとんど得ることはできなかったが, polypeptone (3g/l) と鉄イオン ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ として 0.1~1.5g/l) を含む Czapek-Dox 培地で *A. terreus* IFO 6123 株を振盪培養したところ 80mg/l の収量で得られた。鉄を添加しない場合には, 92 あるいはその des-ferri 体は生産されず, 3,4-dihydro-6,8-dihydroxy-3-methylisocoumarin (93) が得られた。しかし過剰な鉄の添加 (2g/l 以上) によっても 92 の生成量は低下した。

培養には, まず *A. terreus* IFO 6123 株を鉄イオンを含まない Czapek-Dox 培地上 27°C で 2 日間, 前培養した後, 鉄を含む Czapek-Dox 培地に植え継ぎ, さらに 5 日間振盪培養した。ついで暗紫色の菌体を採取し風乾後, 石油エーテルで抽出して脂質を除き, さらに CHCl_3 , MeOH で順次抽出した。 CHCl_3 抽出部には菌体に含まれる鉄の 31.6% が抽出された。 CHCl_3 抽出部をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付しベンゼンと酢酸エチルの 20:1 の混合溶媒で展開し溶出

する赤色部分を *n*-ヘキサンと CHCl_3 の混合溶媒から再結晶したところ mp 188 ~ 189°C (dec.) の astechrome (92) の暗赤色針状晶が得られた。92 の後に溶出する分画からは既知の aspulvinone D²¹⁾ (94) と aspulvinone F²¹⁾ (95) とが単離された。



b) Astechrome の構造について

Astechrome (92) は光学不活性で中性の暗赤色針状晶である。92 はフェロシアン化カリで赤色に呈色するので鉄を含む化合物と推定された。鉄の含量を灰化重量法、灰化後オルトフェナントロリンにより定量する方法および原子吸光法で測定したところそれぞれ 5.56%, 5.36% および 5.16% という値が得られ、さらに 92 の磁化率を測定したところ 5.60 Bohr magneton という値が得られた。従って 92 の鉄原子は常磁性三価の鉄として存在すると考えられた。FD-マスマスペクトルで m/z 1113 に分子イオンピークを示すことおよび元素分析値から、92 の組成式を $\text{C}_{60}\text{H}_{66}\text{FeN}_9\text{O}_9$ と推定した。92 のリガンドと鉄とは強く結合しているため 8-hydroxyquinoline²²⁾ のようなキレート剤では脱鉄することができなかった。一方、92 を Pd-C 存在下接触還元しても hexahydro 体 (96) に変化するに留まったが、 PtO_2 存在下接触還元を行ったところ組成 $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_2$, mp 141 ~ 142°C の脱鉄した 97 が 77% の収率で得られた。本化合物はエールリッヒ反応陽性 (赤紫色) でその UV スペクトルは 272, 283, 293 nm に吸収極大を示す。従って 97 にはインドール核が存在することが推定された。 ^1H -NMR スペクトルは δ 0.95 と δ 1.55, 2.72 に 3-methylbutyl 基に起因するシグナルと δ 2.37 にメチル基, δ 3.95 にメトキシ基, δ 4.07 にメチレンプロトンのシグナル, さらに δ 6.92 ~ 7.55 に 4 個の芳香族プロトンのシグナルを示す。芳香族プロトンのうち 3 個は coupling pattern より、互いに隣接して存在し、残りの 1 個はインドール核の 2 位のプロトン (NH と $J=2.5\text{Hz}$ でカップリング) であることがわかった。97 をアルカリ性で H_2O_2 酸化したところ 3-(3-methylbutyl) anthranilic acid (27) が得られた。従って

97 のイソプレン側鎖はインドール核の 7 位に置換していることが明らかになった。97 の IR スペクトルは $3480, 3350\text{ cm}^{-1}$ にアミノ基, $1650, 1612\text{ cm}^{-1}$ にアミド基の吸収を示す。また UV スペクトルでは先に述べたインドール核の吸収のほか, 長波長側の $325, 365\text{ nm}$ にも吸収があり, 325 nm の吸収はアルカリ性で 347 nm に深色移動することが観察された。97 のこのような性質はその分子内に hydroxy pyrazine のケト型構造が存在することを示唆する。97 の acetate (98), methyl enolate 体 (105) およびその *N*-methyl 体 (箱守法による²³⁾) (99) の IR スペクトルではアミド基の吸収が観察されず, UV スペクトルでも pH 変化による吸収の変化が観察されない。一方, $[3\text{-}^{14}\text{C}]$ tryptophan および $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ alanine の投与実験では標識は各々 14% および 5.6% の率で astechrome (92) に取り込まれた。

以上の結果より 97 の部分構造は Fig. 6 の (a) または (b) であらわされるであろうと考えるに至った。

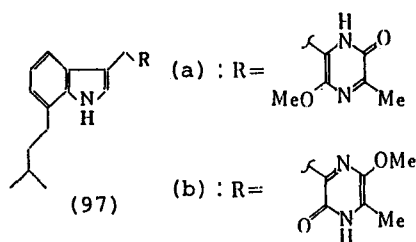


Fig. 6

92 を phosphorus tribromide で処理したところ組成 $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_3$, mp $167\sim 169^\circ\text{C}$ の無色針状晶 (100) が得られた。100 の ^1H -NMR スペクトルは 97 の場合と類似しており, 後者の 3-methylbutyl 基のシグナルに代って 3-methyl-2-butenyl 基のシグナルを示す点が異なっている。100 を Pd-C 存在下接触還元したところ 97 が得られた。

一方, 92 をアセトン中 NaOH で処理したところ組成 $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_3$ の無色粉末 (101) が 90% の収率で得られた。101 は吸湿性でしかも徐々に分解するため結晶化できなかった。本化合物を第二鉄イオン (FeCl_3) と処理したところ 92 が復生し, CuSO_4 と処理したところ組成 $(\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_3)_2\text{Cu}$, mp 162°C の緑色の銅錯体 (102) が得られた。101 を PtO_2 存在下接触還元したところ 97 が得られ, また trimethyl phosphite で処理したところ 100 が得られた。以上の結果より 101 が

astechrome (92) のリガンドであることは明らかである。101 を CH_2N_2 でメチル化したところ組成 $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_3$, mp $129 \sim 130^\circ\text{C}$ の 103 が得られた。103 からはさらに Pd-C 上の接触還元により側鎖の二重結合の飽和した 104 が得られた。

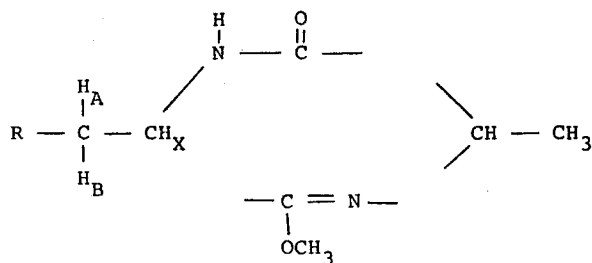
103 の IR スペクトルでは 100 に認められたアミド基の吸収は消失し代って 1230 , 1212 cm^{-1} に *N*-oxide の吸収が新たに観察された。この *N*-oxide の存在は MeOH の CHCl_3 溶液に 103 を加えた時の IR スペクトルの変化から分った。即ち, MeOH の OH 吸収は分子間の会合ができないような希薄溶液では 3610 cm^{-1} に free OH の吸収を示すのみであるが, この溶液に *N*-oxide を加えるとその酸素と MeOH との水素結合の形成により新たに 3320 cm^{-1} に bonded OH の幅広い吸収を示すことが知られている。²⁴⁾ 上記の MeOH の CHCl_3 溶液に少量の 103 を加えた時にもこの現象が観察された。従って 101 にはヒドロキサム酸の部分構造が存在することが示唆された。

また, 92 の UV 吸収は pH 変化 (pH $7.0 \rightarrow 2.0$) によって 450 nm から 520 nm に深色移動する。この現象はヒドロキサム酸基によって第二鉄イオンと錯体を形成している化合物; ferric tribenzohydroxamate²⁵⁾ (440 nm , pH 8.0; 510 nm , pH 1.0), fusarinine iron-complex²⁶⁾ (440 nm , pH 8.0; 500 nm , pH 2.5), ferri-chrome²⁵⁾ (425 nm , pH 8.0; 470 nm , pH 0) などでも観察されている。

次に Fig. 6 の (a) または (b) で示した 97 の pyrazine 環のメチル基とメトキシ基の置換位置について述べる。

97 を EtOH 中 PtO_2 存在下接触還元したところ組成 $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_2$, mp 148°C の 106 が得られた。106 の IR スペクトルは 3540 , 1650 cm^{-1} にアミド基の吸収を示すが, UV スペクトルは 97 で認められた pyrazine 環に起因する吸収を示さない。¹H-NMR スペクトルでは $\delta 4.03$ と $\delta 4.26$ に 2 個のメチンプロトンのシグナルが新生し, $\delta 4.03$ のメチンプロトンは $\delta 1.03$ のメチル基と $J=7.5\text{ Hz}$ でカップリングし, $\delta 4.26$ のメチンプロトンは $\delta 3.19$ のメチレンプロトン (ABX タイプのシグナルの AB パート) と $J=7.5\text{ Hz}$ および 4 Hz でカップリングしさらに $\delta 6.53$ のアミノ基プロトンとも $J=2.5\text{ Hz}$ でカップリングしている。

従って 106 は Fig. 7 に示す部分構造を持つものと推定される。

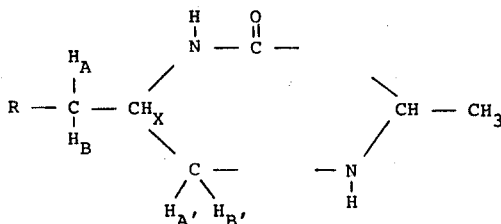


R= 7-isopentylinolyl

Fig. 7

106 を HCl で脱メチル化したところ組成 $C_{19}H_{25}N_3O_2$, mp $235 \sim 237^\circ C$ の 107 が得られた。107 の IR スペクトルは dioxopiperazine 構造をもつ L-alanyl-L-tryptophan のそれと類似し $1677, 1670\text{ cm}^{-1}$ に吸収を示す。107 を 6N HCl で加水分解したところ、2 個のニンヒドリン陽性物質が得られた。TLC およびアミノ酸分析の結果から 1 個は alanine, 他方は 7-(3-methylbutyl)tryptophan と推定された。従って 107 の構造は alanyl-7-(3-methylbutyl)-tryptophan と推定された。

97 を酢酸中 PtO_2 存在下接触還元したところ組成 $C_{19}H_{27}N_3O$, mp $149^\circ C$ の 108 が得られた。108 の 1H -NMR スペクトルではメトキシ基のシグナルが消失し、代って $\delta 3.52$ と $\delta 3.68$ に 2 個のメチンプロトン, さらに $\delta 2.98$ にメチレンプロトンのシグナルの新生が認められた。 $\delta 3.52$ のメチンプロトンは $\delta 0.95$ のメチル基のプロトンと $J=7\text{ Hz}$ でカップリングする。一方, $\delta 3.68$ のメチンプロトンは $\delta 2.98$ のメチレンプロトンと $J=6\text{ Hz}$ と 3.5 Hz でカップリングし, さらに $\delta 3.08$ のメチレンプロトンとも



R= 7-isopentylinolyl

Fig. 8

$J=5\text{ Hz}$ と 3 Hz でカップリングする。従って **108** は Fig.8 に示す部分構造を持つものと推定された。

以上の結果より **97** の構造は Fig.6 の(a)で示されることが明らかになり astechrome (**92**) は tris[1-hydroxy-5-methoxy-6-methyl-3[[7-(3-methyl-2-butenyl)-indol-3-yl]methyl]-2-pyrazinonate- $0^1, 0^2$] iron であることが明らかになった。

Chart 27 に astechrome (**92**) に関連した諸反応を示す。

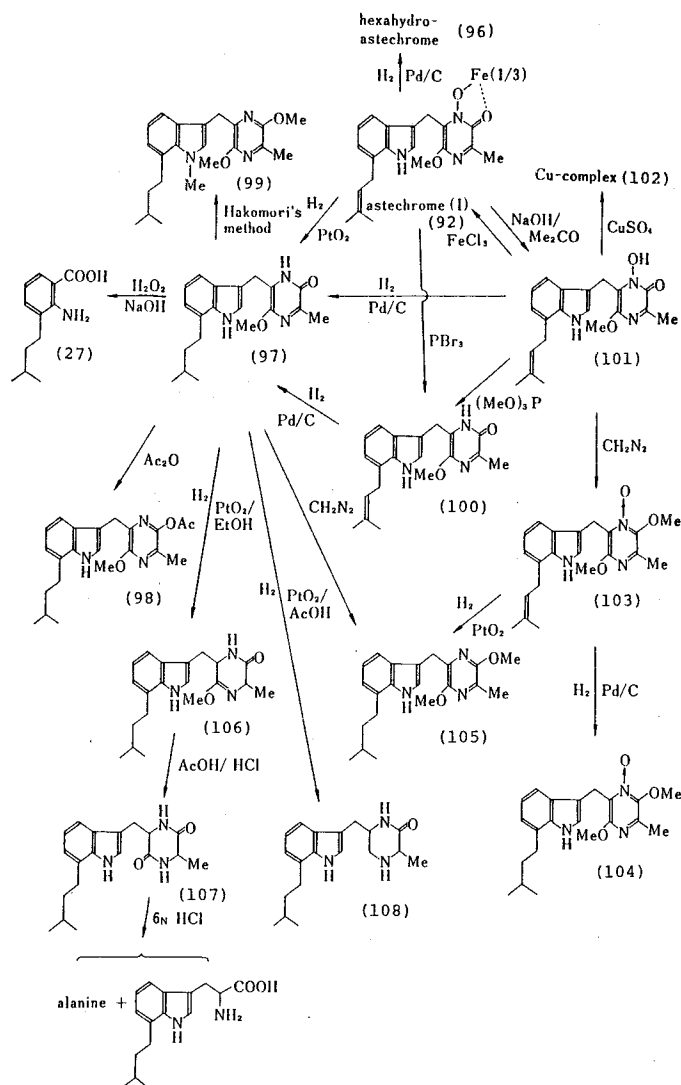


Chart 27

かびから単離された tryptophan を含む, 2,5-dioxopiperazine 化合物としては, echinulin, sporidesmin, fumtremorgen, roquefortine などが知られている。²⁷⁾ これらは一般に抗菌性を示すが, 一部は抗かび性も示す。一方, ヒドロキサム酸の鉄錯体としては上記の astechrome のほかに aspergillic acid, rhodotorulic acid, pulcherriminic acid, mycelianamide などが知られている。これらの化合物のなかには, 抗菌性や抗腫瘍性を示すもの, かびの生長因子として働くもの, 鉄イオンの輸送体として働くものなど多彩な生理活性をもつものも知られている。²⁸⁾

Astechrome (92) の場合, 弱い抗菌性を示したが, Ehrlich's ascites carcinoma に対する抗腫瘍性は認められなかった。

第3章 *Aspergillus terreus* IFO 4100 株の代謝産物 astepyrone について

A. terreus IFO 4100 株は他の株とは異なり含窒素代謝産物を生産せず, astepyrone と命名した furo [2, 3-b] pyran 構造を持つ新規な代謝産物などを生産する。本化合物は生合成的に非常に興味のある物質でポリケタイド由来の orsellinic acid の芳香環が開裂し生合成されたものであることが明らかにされた。

第1節では astepyrone (109) およびその他の新代謝産物の単離と構造について、第2節では astepyrone の生合成について述べる。

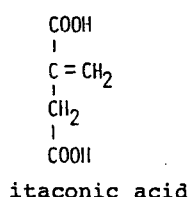
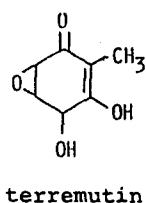
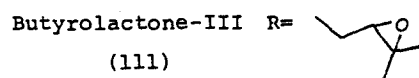
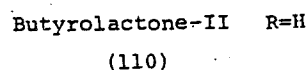
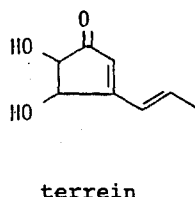
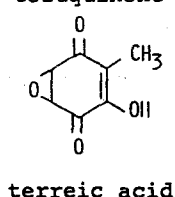
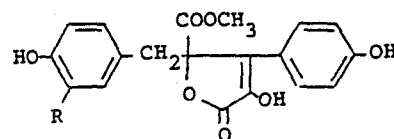
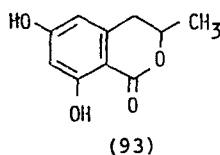
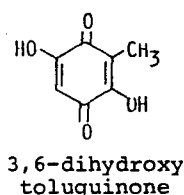
第1節 *A. terreus* IFO 4100 株の代謝産物の単離とその構造について

a) *A. terreus* IFO 4100 株の代謝産物の単離

A. terreus IFO 4100 株を麦芽エキスイ培地に植菌し 27°C で3週間培養後酢酸エチルで抽出した。この抽出液をさらに 10% NaHCO₃ で抽出して得た酸性分画をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分画し, terreic acid, teremutin, itaconic acid, orsellinic acid, 3, 6-dihydroxytoluquinone を単離した。しかしこのようにアルカリ処理したときは astepyrone は単離できなかったため、つぎに培養液をエーテルおよび酢酸エチルで抽出し、各抽出部をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離する方法を行った。

エーテル抽出部からは butyrolactone-I (2), butyrolactone-I の脱プレニル化体 (butyrolactone-II, 110) および epoxide (butyrolactone-III, 111) の他、2種の isocoumarin 化合物が単離された。1種は mp 190~192°C, 無色針状の新代謝産物 (112) で他の1種は terrein の生合成前駆体とされている (3*R*)-3,4-dihydro-6,8-dihydroxy-3-methylisocoumarin (93) であった。²⁹⁾

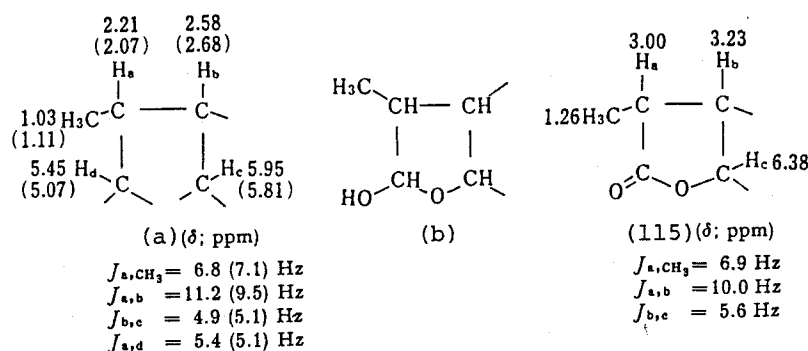
酢酸エチル抽出部からは mp 133~134°C の astepyrone (109) と mp 154~156°C の astepyrone 類縁化合物 (113) および terrein が単離された。



b) Astepyrone の構造

Astepyrone(109) は組成 $C_9H_{12}O_5$, $[\alpha]_D^{14} + 80.7^\circ$ (pyridine) の中性物質で、酸、アルカリ特にアルカリに対して不安定である。109の IR スペクトルは 3334 cm^{-1} に水酸基, 1675 および 1663 cm^{-1} にカルボニル基, 1630 cm^{-1} に二重結合の吸収を示し, UV スペクトルは 235 nm ($\log \epsilon$ 4.06) に極大吸収を示す。これらのスペクトルデータは 109 に α, β -不飽和- γ -ラクトンの部分構造が存在することを示唆するものである³⁰⁾。109 の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルは 2 種の化合物の等量混合物のようなシグナルパターンを示し, 各組は各々 δ 1.03 と δ 1.11 のメチル基, δ 3.74 と δ 3.76 のメトキシ基, δ 6.70 のブロードな水酸基プロトンのシグナルおよび 5 組のメチンプロトンのシグナルからなり, メチンプロトンのうち 1 組は δ 5.11 と δ 5.18 にシングレットとして, 2 組は δ 5.45 と δ 5.07 および δ 5.95 と δ 5.81 のダブルットとして, また最後の 2 組は δ 2.21 と δ 2.07 および δ 2.58 と δ 2.68 にダブルダブルットとしてあらわれる。これら各プロトンは spin-decoupling 実験の結果から Fig.9 の(a)に示す関係にあることが明らかにされた。

1 個の水酸基の存在は mono-*p*-nitrobenzoate (114) が得られたことから支持された。



Figures in brackets are chemical shifts and coupling constant values of the anomer.

Fig. 9

Astepyrone (109) は銀鏡反応陽性であるが、IRおよびNMR スペクトルからはアルデヒド基の存在は認められない。109を氷酢酸中 CrO_3 酸化したところ組成 $C_9H_{10}O_5$, mp 98~99°Cの酸化産物(115)が得られた。115は銀鏡反応陰性でそのIRスペクトルでは水酸基の吸収が消失し代って 1804 cm^{-1} にラク톤のカルボニル基の吸収が認められる。 1H -NMRスペクトルはastepyroneの場合と異なり組成式 $C_9H_{10}O_5$ に対応する1組のシグナルを示すのみである。従ってastepyrone (109)はcyclic hemiacetalの部分構造を持ち、溶液状態ではそのために2種の混合物のようなシグナルを示したものと考えられる。ラク톤体(115)の 1H -NMRスペクトルで δ 1.26のメチル基と δ 3.00のメチンおよび δ 3.23のメチンプロトンとの間の関係はFig. 9の(a)の場合と同じなので先に(a)で示したastepyrone (109)の部分構造は(b)に発展する。

Astepyrone(109)を BF_3 -etherate存在下ethanedithiolと処理したところ2分子のethanedithiolが反応し組成 $C_{13}H_{20}O_3S_4$, mp 157~159°Cの反応産物(118)が得られた。従ってastepyrone (109)は2個のアセタール部分構造を持つものと推定された。本化合物はIRスペクトルでca. 3100~2600, 1668 cm^{-1} にカルボキシ基の吸収を示す酸である。 1H -NMRスペクトルは δ 1.12にメチル基, δ 3.68にメトキシ基, δ 3.13と δ 3.23に2個の連続するメチレン基のシグナルのほか δ 2.46, 4.39, 4.68, 4.73, 5.18に5個のメチンプロトンのシグナルを示す。このうちメチル基と δ 2.46, 4.39, 4.68, 4.73の4個のメチンプロトンは109の場合と同様に $CH_3-CH-CH-$ の関係を持つことがspin-decoupling実験から明らかにされた。

次に 118 を W_2 -Raney-Ni で脱硫したところ組成 $C_9H_{18}O_3$ の油状物質 (119) が得られた。この化合物の炭素骨格は astepyrone の全炭素骨格を保持している。119 の 1H -NMR スペクトルではメトキシ基のシグナルが δ 3.36 と δ 3.38 に 7 : 5 の割合で観察されたので 119 は 2 種のジアステレオマーの混合物であると推定された。さらに 1H -NMR スペクトルは δ 0.77 ~ 0.98 に 3 個のメチル基, δ 1.61 に 2 個のメチンプロトン, δ 2.48 に 1 個のメチレン, δ 3.69 に 1 個のメチンプロトンのシグナルを示している。これらのスペクトルデータおよび 118 の構造に基づき 119 は 2,3-dimethyl-4-methoxyhexanoic acid であろうと推定された。この推定は, 119 のマスペクトルで m/z 175 に ($M^+ + 1$) のピークのほか, m/z 142 ($M^+ - CH_3O$) のピーク, m/z 115 に ($M^+ - CH_2COOH$) のピーク, m/z 103 に $\left[\begin{array}{c} -CH-CH_2-COOH \\ | \\ OCH_3 \end{array} \right]$, m/z 70 に $\left[\begin{array}{c} CH_3-CH-CH- \\ | \quad | \\ CH_3 \quad CH_3 \end{array} \right]$, m/z 43 に $[CH_3-CH-CH_3]$ のフラグメントピークが観察されることから支持された。

以上の結果より astepyrone (109) は tetrahydro-2-hydroxy-3-methyl-4-methoxy-6-oxo-furo[2,3-b]pyran であることが明らかになった。

このことは astepyrone (109) をアンモニア水で処理すると mp 117 ~ 119°C の 3-acetyl-4-methylpyrrole (116) (文献値,³¹⁾ mp 117 ~ 119°C; その semicarbazone

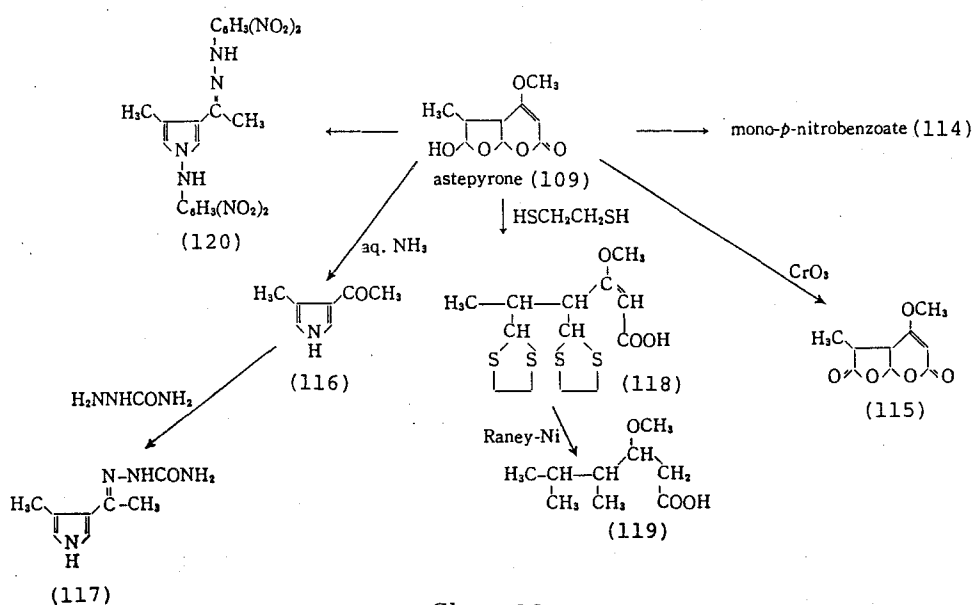


Chart 28

体 (117), mp 193~195°C (文献値,³²⁾ mp 195°C)) が得られることから支持される。また, 109 を 2,4-dinitrophenylhydrazine で処理したところ di-dinitrophenylhydrazone (120), mp 295~296°C が得られた。

上記の astepyrone (109) に関する反応を Chart 28 に示す。

c) Astepyrone 類似の代謝産物の構造

113 は組成 $C_{10}H_{16}O_5$, $[\alpha]_D^{29} + 79^\circ$ (EtOH) の無色針状晶である。10% $NaHCO_3$ 液に可溶で IR スペクトルは ca. 3000~2500, 1680 cm^{-1} にカルボキシ基の吸収を示し, UV スペクトルは 233nm に極大吸収を示す。113 の NMR スペクトルデータは Table 9 に示す通りである。

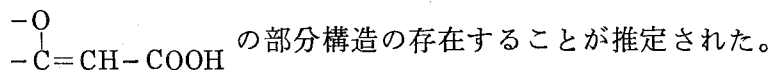
Position	^{13}C -NMR	^1H -NMR
2	106.7 (d, $J=167.5\text{ Hz}$)	4.85 (d, $J=4.6\text{ Hz}$)
3	42.8 (d, $J=132.4\text{ Hz}$)	2.44 (ddq, $J=10, 7.1, 4.6\text{ Hz}$)
4	44.8 (d, $J=133.3\text{ Hz}$)	4.41 (ddd, $J=10, 9, 7.6\text{ Hz}$)
5	69.8 (t, $J=148.5\text{ Hz}$)	3.80 (dd, $J=7.6, 7.6\text{ Hz}$) 4.15 (dd, $J=9, 7.6\text{ Hz}$)
6	175.3 (s)	-
7	92.9 (d, $J=147.5\text{ Hz}$)	5.14 (s)
8	172.6 (s)	-
9	11.6 (q, $J=125.5\text{ Hz}$)	1.01 (d, $J=7.1\text{ Hz}$)
10	54.8 (q, $J=143.0\text{ Hz}$)	3.36 (s)
11	56.1 (q, $J=145.0\text{ Hz}$)	3.69 (s)

(δ ; in $CDCl_3$)

Table 9

ここで 2, 3, 4, 5 位のプロトンは spin-decoupling 実験から $\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}- \\ | \quad | \\ >\text{CH} \quad \text{CH}_2 \end{array}$ の関係にあることが示された。113 の ^{13}C -NMR スペクトルは astepyrone (109) のメチン炭素のシグナルに代ってメチレン炭素のシグナルを示し, また 2 個のメトキシ基のシグナルも示す。2 位の炭素は $J=167.5\text{ Hz}$ のダブルットとして観察されることから 2 個の酸素に挟まれたメチン炭素であり, また 5 位の炭素は $J=148.5$

Hz のトリプレットとして観察されることから 1 個の酸素に結合したメチレン炭素と予想された。そのほか、6～8 位の炭素の chemical shift 値から 113 に



従って 113 の構造は Fig. 10 の(a)または(b)で示すことができる。

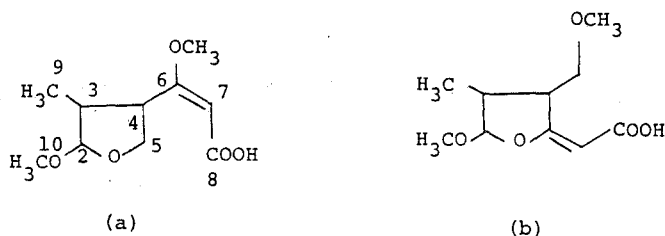


Fig. 10

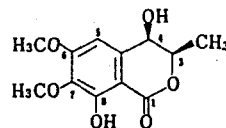
一方、 ^{13}C -NMR スペクトルで 11 位のメトキシ基のプロトンを選択的 decoupling すると 6 位の炭素のシグナルが単純となることより、このメトキシ基が 6 位の炭素に置換していることがわかる。

以上の結果、113 の構造は Fig. 10 の(a)であることが明らかとなった。この構造は astepyrone (109) の構造と極めて近縁のものである。

d) その他の代謝産物の構造

代謝産物 112 は組成 $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_6$ の無色針状晶である。その UV スペクトルは 219, 228 (sh), 273, 307 nm に吸収極大を示し、3,4-dihydro-6,8-dihydroxy-3-methylisocoumarin の場合と類似している。112 を赤リンとヨードで処理して得た脱水体, mp 195～197°C およびそのアセテート, mp 184～186°C を 6,7-dimethoxy-8-hydroxy-3-methylisocoumarin およびそのアセテートと比較したところ、いずれも完全に一致した。³³⁾

112 の ^1H -NMR スペクトルは部分構造 $\begin{array}{c} \text{OH} \quad \text{CH}_3 \\ | \quad | \\ -\text{CH}-\text{CH}-\text{O}- \end{array}$ の存在を示し、しかも 2 個のメチンプロトンは $J=2\text{Hz}$ でカップリングしているので両者は *cis* 配置である。³⁴⁾ 一方、112 は 273 nm に負の Cotton 効果を示すからその C-3 位の絶対配置は *R* と決定した。³⁵⁾



(112)

従って 112 は (3*R*, 4*R*)-3,4-dihydro-4,8-dihydroxy-

6, 7 - dimethoxy - 3 - methylisocoumarin であることが明らかになった。

第2節 Astepyrone の生合成について

Astepyrone (109) は酢酸-マロン酸経路により生合成されるものと推定して $[2-^{14}\text{C}]\text{CH}_3\text{COONa}$ の投与実験を行ったところ、放射能は主として菌体の脂質部分（全投与量の 50%，菌体部の 70%）に取り込まれ 109 には僅かに 0.5% が取り込まれたにすぎなかった（その他 terrein に 5.6%，butyrolactone-I (2) に 0.85% 移行した）。この結果より ^{14}C 化合物を投与後、 ^{14}C の分布を分解反応で調べることは量的にやや難しいと考え、次に $[1-^{13}\text{C}]\text{CH}_3\text{COOH}$ を投与する方法を採用した。Astepyrone (109) は ^{13}C -NMR スペクトルにおいても複雑なシグナルパターンを示すので $[1-^{13}\text{C}]\text{CH}_3\text{COONa}$ 投与後単離した 109 はラクトン体 (115) に誘導しスペクトルを測定した。115 の ^{13}C -NMR スペクトルにおける帰属は chemical shift 値、シグナルの分裂様式および ^1H -selective decoupling 実験にもとづいて行った。その結果を Table 10 に示す。

Carbon No	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Chemical Shift	161.7	89.3	170.4	44.3	97.0	38.6	175.2	14.7	56.9
Splitting Pattern	s	d	s	d	d	d	s	q	q

s= singlet, d= doublet, q= quartet

Table 10

δ 14.7 と δ 56.8 のシグナルは chemical shift 値およびシグナルの分裂様式から容易に C-9 位のメチル基と C-10 位のメトキシ基に帰属される。 δ 89.3, 44.3, 97.0 および δ 38.6 の各シグナルは selective decoupling 実験の結果よりそれぞれ C-3, C-5, C-6 位および C-7 位に帰属された。 β -methoxy- α,β -unsaturated- δ -lactone のカルボニル炭素 (C-2 位) はメトキシ基の置換する炭素 (C-4 位) に比べて高磁場に、しかもシングレットとしてあらわれる。また C-4 位のシグナルはメトキシ基のプロトンとの間の long range coupling により複雑な coupling

patternを示すことが知られている。³⁶⁾ 115 では δ 161.7 のシグナルのみがシングレットとしてあらわれるので、これをC-2位の炭素に帰属した。一方、 δ 170.4 と δ 175.2 のシグナルは複雑な coupling pattern を示すが、C-10位のメトキシ基のプロトンを選択的 decoupling すると δ 170.4 のシグナルが単純になり、C-9位のメチル基のプロトンを選択的 decoupling すると δ 175.2 のシグナルが単純になる。この結果より δ 170.4 のシグナルをC-4位に、 δ 175.2 のシグナルをC-8位にそれぞれ帰属した。

$[1-^{13}\text{C}]\text{CH}_3\text{COONa}$ 投与後、単離した astepyrone (109) を酸化して得たラクトン体の ^{13}C -NMR スペクトルを Fig.11 に示す。このスペクトルからラクトン体、従って astepyrone (109) の炭素は交互に ^{13}C で enrich されていることが明らかになった。このシグナルパターンと 109 の構造とから 109 の生合成前駆体としては *A. terreus* IFO 4100 株から同時に単離されている orsellinic acid が候補にあ

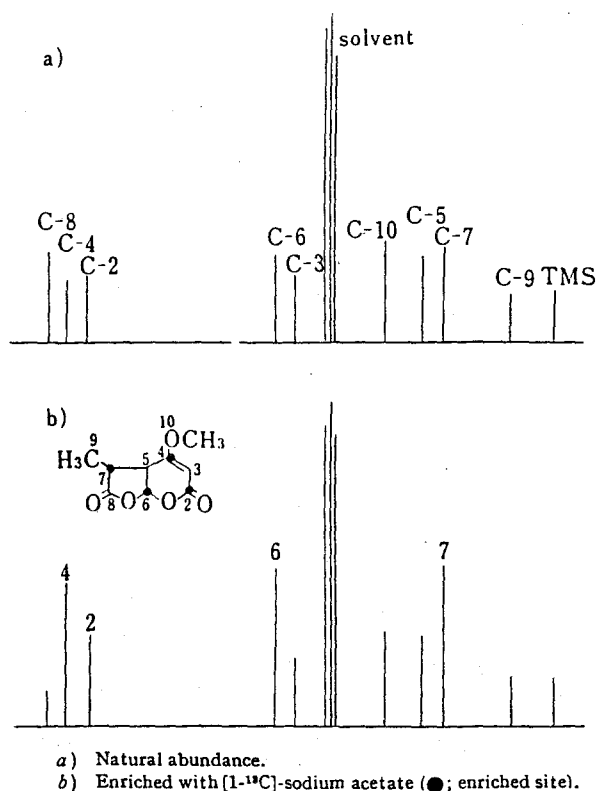


Fig.11

げられ、その C-4 位と C-5 位の環開裂を想定すれば **109** の生合成は容易に理解できると考えられた (Chart 29)。Orsellinic acid が環開裂すると脱炭酸しやすい β -ケト酸に変化するが、もし、その 2 位の水酸基が環開裂の前にメチル化されておれば開環生成物は安定であろう。従って 2-O-methylorsellinic acid も前駆体となる可能性があるであろう。また **109** の構造から考えると orsellinic acid のカルボキシ基はアルデヒド基である方が **109** への変換は容易であろう。このような考察に基づき上記の 3 種類の物質の ^{14}C 標識体の合成を行った。

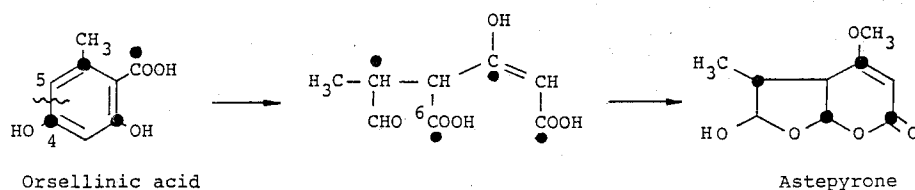


Chart 29

^{14}C Orsellinaldehyde は orcinol と ^{14}C NaCN と $\text{Zn}(\text{CN})_2$ を用いる Thomas 法³⁷⁾で合成し、 ^{14}C orsellinic acid はアルデヒド体を酸化して合成した。2-O- ^{14}C Methylorsellinic acid は ethyl-4-ethoxycarbonylorsellinate を ^{14}C CH_3I でメチル化した後加水分解して合成した。

以上の 3 種の ^{14}C 標識化合物を培養開始後、5 日、10 日および 15 日目の培養

Administered compound	Day of administration	Amount added ($\times 10^6$ dpm)	Incorporation into astepyrone		Distribution of radioactivity (%)			
			Amount (mg/l)	(%)	Culture broth	Mycelium	Respiratory CO_2	Total
$^*\text{CH}_3\text{COONa}$	5	108	195	0.5	18	70	9	97
	5	1.56	308	8.2	53	4	24	81
	10	1.41	240	18.1	70	3	23	96
	15	1.64	186	15.3	51	5	30	86
	5	2.22	290	4.5	77	10	0	87
	10	2.10	266	22.2	90	7	0	97
	15	2.23	220	16.8	82	13	0	95
	5	2.10	266	0.5	85	3	0	88
	10	1.88	155	0.1	89	3	0	92
	15	1.78	88	0.4	90	2	0	92

* Labelled site.

Table 11

液に投与し各々さらに 3 週間培養を続けてから、**109** を抽出単離し放射能を測定した。その結果を Table 11 に示す。

2-O- $[^{14}\text{C}]$ Methylorsellinic acid の **109** への取り込み率は 0.5 % 以下であり他の場合と比べはるかに低かった。従ってメチル化が orsellinic acid の環開裂以前に起こるとは考え難い。一方、 $[^{14}\text{C}]$ orsellinic acid と orsellinaldehyde の取り込み率はともに約 20% で、両者とも **109** の生合成前駆体であることが明らかになった。また、Table 11 に示すように $[^{14}\text{C}]$ orsellinic acid を投与したとき培養期間中に発生した CO_2 には放射能が認められたが、 $[^{14}\text{C}]$ orsellinaldehyde を投与した場合はこれが認められなかった。この結果から放射性的 CO_2 は orsellinic acid の脱炭酸により生じたものと考えられ、さらにこのかびでは orsellinaldehyde から orsellinic acid への酸化はほとんど起こらないものと考えられる。即ち、orsellinaldehyde は orsellinic acid より **109** に近い前駆体であることが推定される。

従って astepyrone (**109**) の生合成経路は Chart 30 のように推定される。芳香族化合物の環開裂により生成したかびの二次代謝産物としては、patulin, penicillic acid が知られている³⁸⁾。

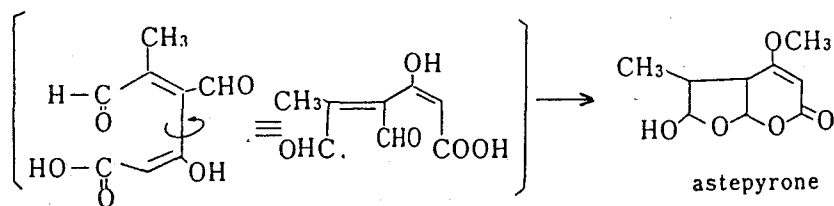
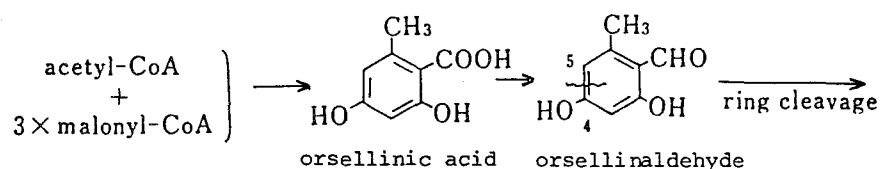
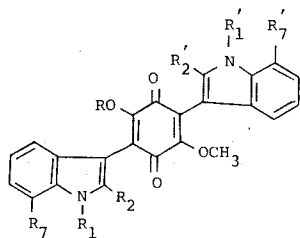


Chart 30

結 論 と 要 約

抗腫瘍性物質 asterriquinone の類縁化合物の検索に端を発し, *Aspergillus terreus* の代謝産物の検索を行い多数の代謝産物を単離し, それら代謝産物の構造ならびに生合成について次の知見を得た。

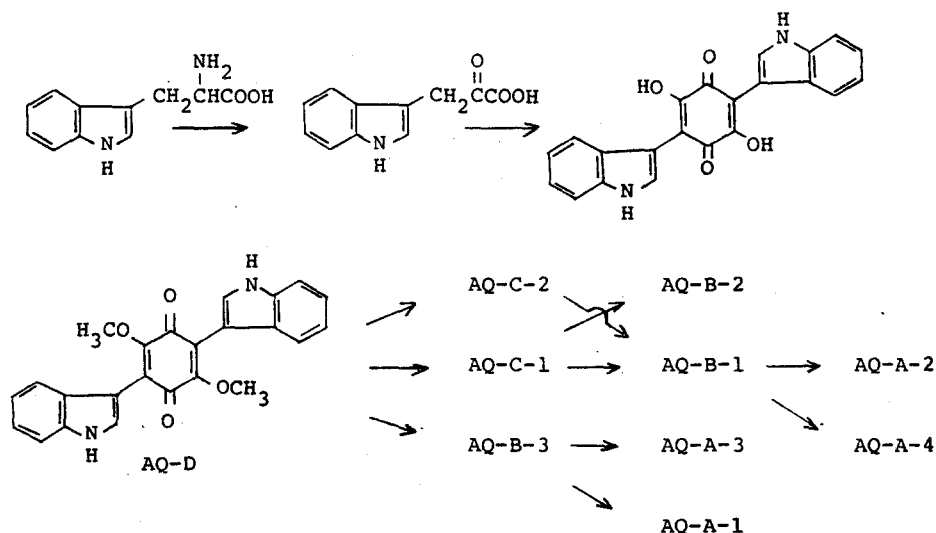
1) *A. terreus* IFO 6346 株および var. *africanus* IFO 8835 株を麦芽エキース培地で培養し下記の 13 種の asterriquinone 類縁体を単離し, それらの構造を決定した。



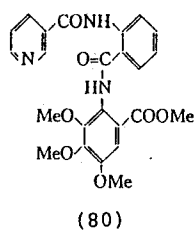
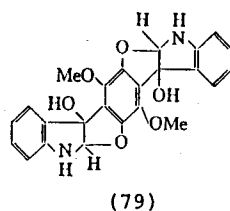
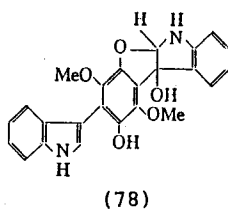
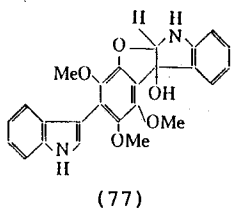
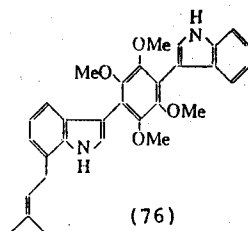
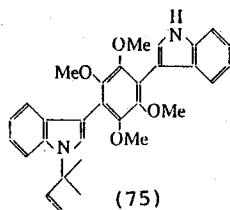
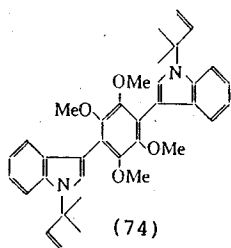
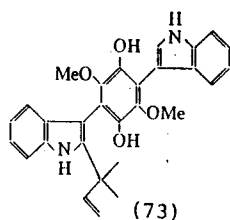
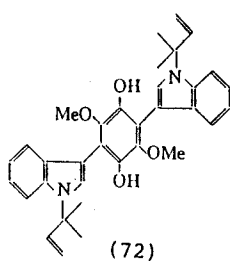
Compounds		Position of Prenyl Groups in Asterriquinone	
R=CH ₃	AQ-A-1 (4)	R ₁ , R ₁ '	-
	AQ-A-2 (5)	R ₂	R ₇ , R ₇ '
	AQ-A-3 (6)	R ₁ , R ₂ '	-
	AQ-A-4 (7)	R ₂ , R ₂ '	R ₇
	AQ-B-1 (8)	R ₂	R ₇ '
	AQ-B-2 (9)	R ₂	R ₇
	AQ-B-3 (10)	R ₁	-
	AQ-B-4 (11)	R ₂ , R ₂ '	-
	AQ-C-1 (12)	R ₂	-
	AQ-C-2 (13)	-	R ₇
	AQ-D (14)	-	-
	AQ-F (16)	-	R ₂ , R ₂ '
R=COCH ₃	AQ-E (15)	-	R ₂ , R ₂ '

2) 上記の asterriquinone 類縁体を抗腫瘍活性物質に誘導するため、それらの 3,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone 部分の脱メチル化を行ったところ、①3,3-dimethylallyl 基への水和、②3,3-dimethylallyl 基とインドール核窒素との間の環化、③インドール核窒素に置換する 1,1-dimethylallyl 基の C-2 位への Claisen 転位、および④脱離などの副反応がおこることを認めた。

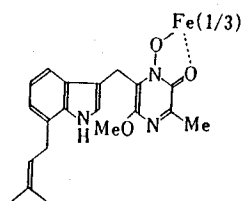
3) 無細胞系での生合成実験により、上記の asterriquinone 類のベンゾキノン骨格は indolepyruvic acid 2 分子が C-1 と C-3' 位、C-1' と C-3 位間で縮合して形成されること。さらにキノン核の水酸基がメチル化されたのち、はじめてプレニル基がインドール核に段階的に導入されることを推定した。Asterriquinone 類の生合成経路は下図に示す通りと考えられる。



4) 上記の asterriquinone 類の他に IFO 8835 株からは asterriquinol 誘導体 8 種, tripeptide 様代謝産物 1 種を単離し、各々次図のような構造を持つことを明らかにした。

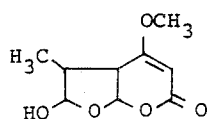


5) Asterriquinone 生産株である IFO 6123 株を Czapek-Dox 培地で振盪培養し、新たに tryptophan 由来の dioxopiperazine 誘導体の鉄錯体 (astechrome) を単離することができた。本物質は右の構造を持つ。

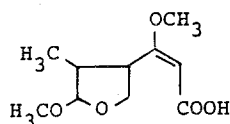


Astechrome (102)

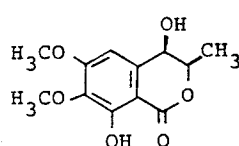
6) *A. terreus* IFO 4100 株より astepyrone 等 3 種の新代謝産物を単離しそれらの構造を明らかにした。



Astepyrone (109)

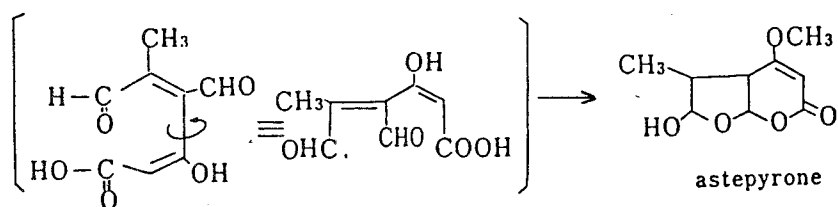
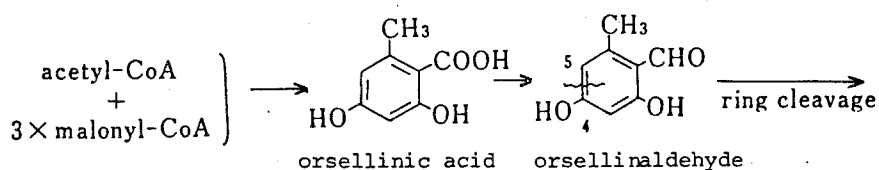


(113)



(112)

7) Astepyrone はポリケタイド由来の代謝産物であることをみとめ、さらに [^{14}C] orsellinaldehyde その他の投与実験により、本物質が orsellinaldehyde の C-4 位と C-5 位の間で環開裂して生合成されたものであることを明らかにした。



以上の研究結果は、*Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 961 (1981), *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 991 (1981), *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 1005 (1981), *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 1510 (1981), *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 925 (1983) に於いて報告したものである。

謝 辞

終わりに臨み、本研究に際し終始御指導御鞭撻を賜りました恩師金沢大学薬学部山本譲教授に心より感謝の意を表します。

また本論文を作成するにあたり、御校閲と種々の御助言を賜りました京都大学薬学部井上博之教授に深く感謝致します。

本研究にあたり、終始御助言御協力を賜りました金沢大学薬学部新田啓一助教授、清水栄助手並びに生化学教室の学生諸氏、およびNMRスペクトル、マスペクトルの測定と元素分析を施行され種々の御討論をして頂いた金沢大学薬学部板谷芳京講師をはじめ中央分析室の諸氏に感謝致します。

また貴重な試料を分与して頂いた名城大学薬学部井上昭二教授に感謝致します。

実 験 の 部

物理的測定は下記の機器を用いて行った。

mp : 柳本製作所製微量融点測定器, すべて未補正

UV : 日立自記分光光度計 323 型

IR : 日本電子赤外分光光度計 IR-G 型

日本分光 A-202 型

NMR : 日本電子 JNM-PMX-60 型および JNM-FX-100S 型

MS : 日立 M-80 型

CD : 日本分光 J-500C 型

$[\alpha]_D$: 日本分光 DIP-181 型

アミノ酸分析計 : 日立 835-30 型

カラムクロマトグラフィーは下記の吸着剤を用いて行った。

シリカゲル : 関東化学 クロマト用(100~200 mesh), Mallinckrodt silicic acid CC-7

珽酸処理シリカゲル : 上記シリカゲルを 0.1M 珽酸中に懸濁して一夜放置後, 汙取水洗して 100°C,
1 時間乾燥したもの

アルミナ : Merck alumina, activated abt. 300 mesh

試薬は下記のものを用いた。

Glucose : 第一製薬 注射用ブドウ糖

Malt extract : Difico

Polypeptone : 大五栄養化学

標識化合物は下記のものを用いた。

$[1-^{13}\text{C}] \text{CH}_3\text{COONa}$: Amersham International

$[^{14}\text{C}] \text{NaCN}$: New England Nuclear

$[1-^{14}\text{C}] \text{CH}_3\text{COONa}$, $[^{14}\text{C}] \text{CH}_3\text{I}$, $[3-^{14}\text{C}] \text{Trp}$: Amersham International

比放射活性測定 : 試料をジオキサンシンチレーター (ナフタリン, 100 g ; PPO, 7 g ; POPOP 0.3 g ; dioxane, 1 l) にとかし, Aloka liquid scintillation counter LSC-651 型を用い測定した。菌体部の放射活性は試料燃焼装置 (Packard 306 型) で測定した。

第 1 章に関する実験

§ 第 1 節と第 2 節に関する実験

A. terreus IFO 6346 と var. *africanus* IFO 8835 の培養

培養液として glucose, 20 g ; malt extract, 20 g ; polypeptone, 5 g を水道水 1 l にとかしたものをを用いた。これを 200 ml ずつ Roux flask に分注し高圧滅菌 (120°C, 10 分) 後, *A. terreus* IFO 6346 または var. *africanus* IFO 8835 を植菌, 27°C で 2 週間静置培養した。

A. terreus var. *africanus* IFO 8835 の代謝産物の抽出, 単離

菌体を汙取, 温風乾燥後 (90 g/6 l 培養液) よく粉碎し, ソックスレー抽出器で石油エーテル, Et₂O の順に各々約 15 時間抽出した。

石油エーテル抽出部には AQ-A 群が主として抽出された。

Et₂O 抽出液は 10% Na₂CO₃ で抽出し butyrolactone-I (2) が含まれる酸性画分を除去した。

Et₂O 層を一夜放置すると黄色の結晶が析出した。これを汉取, MeOH から再結晶し mp 105~107°C (文献値,⁴⁾ mp 107~110°C), 黄色プリズムの citreoviridin (3) を得た。

Anal. Calcd for C₂₃H₃₀O₆ : C, 68.63 ; H, 7.51

Found : C, 68.28 ; H, 7.56

MS *m/z* : 402 (M⁺), 340, 302, 259, 139

UV λ_{max}^{EtOH} nm (log ε) : 288 (4.39), 296 (4.43), 390 (4.68), 400 (sh, 4.13)

[α]_D¹⁶ -105° (c = 1.0, MeOH)

汉液を濃縮し油状の残渣を得た。これを *n*-ヘキサンで抽出, 可溶部を先の石油エーテル抽出部と合せ以下の分離操作を行った。

AQ-A 群の単離

石油エーテル抽出部と *n*-ヘキサン抽出部を合せ濃縮。得られた赤褐色油状の残渣を MeOH で抽出し, 可溶部 (紫色色素を多く含む) と不溶の油状物質とに分離。可溶部を減圧濃縮してゆくと ergosterol が析出した。これを汉別し汉液は減圧乾固する。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付しベンゼンで展開。油状物質が溶出した後, まず最初に溶出する赤色の画分を集め濃縮後, 残渣を MeOH から再結晶し mp 167~168°C, 暗紫色針状の AQ-A-1 (4) (収量, 24 mg) を得た。次に溶出する赤紫色の画分は isopropyl alcohol から再結晶し mp 189~192°C, 紫色針状の AQ-A-2 (5) (収量, 28 mg) を得た。続いて溶出する赤色の画分はアルミナカラムクロマトグラフィー (ベンゼン : AcOEt (19 : 1 v/v)) で分離した。まず AQ-A-4 (7) を含む赤色の画分が溶

出し、次にAQ-A-3(6)を含む赤紫色の画分が溶出した。AQ-A-3(6)とAQ-A-4(7)の分離にはMeOHによる分別再結晶も有効で、AQ-A-4(7)はMeOHに難溶なので容易に分けられる。AQ-A-3(6)は最終的には*n*-ヘキサンから再結晶し暗紫色微細結晶, mp 112~114°C (収量, 25 mg) として得た。またAQ-A-4(7)は最終的にはMeOHから再結晶し赤紫色プリズム晶, mp 252~253°C (収量, 21 mg) として得た。

AQ-A-1(4)の性質

Anal. Calcd for $C_{34}H_{34}N_2O_4$: C, 76.38; H, 6.41; N, 5.24

Found: C, 76.34; H, 6.98; N, 5.43

MS *m/z*: 534 (M^+), 466, 423, 398, 69

1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 1.86 (12H, s), 3.80 (s, 2OCH₃), 5.24 (2H, d, $J=17.5$ Hz), 5.28 (2H, dd, $J=17.5, 11$ Hz), 6.24 (2H, dd, $J=17.5, 11$ Hz), 7.08~7.72 (10H, m, aromatic H)

AQ-A-2(5)の性質

Anal. Calcd for $C_{39}H_{42}N_2O_4$: C, 77.71; H, 7.02; N, 4.65

Found: C, 77.76; H, 6.98; N, 4.53

MS *m/z*: 602 (M^+), 533, 464, 303

1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 1.49 (6H, s), 1.83 (6H, s), 1.88 (6H, s), 3.58 (4H, d, $J=7$ Hz), 3.70, 3.80 (each s, OCH₃), 5.10 (1H, dd, $J=10, 1$ Hz), 5.14 (1H, dd, $J=17.5, 1$ Hz), 5.44 (2H, t, $J=7.5$ Hz), 6.08 (1H, dd, $J=17.5, 10$ Hz), 6.90~7.50 (7H, m, aromatic H), 8.16, 8.50 (each s, NH)

AQ-A-3(6)の性質

Anal. Calcd for $C_{34}H_{34}N_2O_4$: C, 76.38; H, 6.41; N, 5.24

Found: C, 76.13; H, 6.49; N, 5.31

MS *m/z*: 534 (M^+), 466, 397, 69

1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 1.37 (6H, s), 1.75 (6H, s), 3.60, 3.73 (each s, OCH₃), 4.73 (1H, dd, $J=9.5, 1.5$ Hz), 4.93 (1H, dd, $J=17.5, 1.5$ Hz), 5.05 (1H, dd, $J=17.5, 1.5$ Hz), 5.10 (1H, dd, $J=9.5, 1.5$ Hz), 6.06 (1H, dd, $J=17.5, 9.5$ Hz), 6.08 (1H, dd, $J=17.5, 9.5$ Hz), 6.50~7.43 (9H, m, aromatic H), 8.13 (1H, s, NH)

AQ-A-4(7)の性質

Anal. Calcd for $C_{39}H_{42}N_2O_4$: C, 77.71; H, 7.02; N, 4.65

Found: C, 77.75; H, 7.03; N, 4.79

MS *m/z*: 602 (M^+), 533, 464, 69

1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 1.45, 1.54 (each s, 2CH₃), 1.82, 1.88 (each s, CH₃), 3.58 (2H, d, $J=7.5$ Hz), 3.74 (s, 2OCH₃), 5.06 (1H, dd, $J=10, 1.2$ Hz), 5.12 (1H, dd,

$J=17.5, 1.2\text{Hz}$), $5.14 (1\text{H}, \text{dd}, J=10, 1.2\text{Hz})$, $5.16 (1\text{H}, \text{dd}, J=17.5, 1.2\text{Hz})$,
 $5.46 (2\text{H}, \text{t}, J=7.5\text{Hz})$, $6.08 (1\text{H}, \text{dd}, J=17.5, 10\text{Hz})$, $6.10 (1\text{H}, \text{dd}, J=17.5, 10\text{Hz})$,
 $6.80\sim 7.36 (7\text{H}, \text{m}, \text{aromatic H})$, $8.16 (2\text{H}, \text{s}, \text{NH})$

AQ-B群, AQ-C群, AQ-Dの単離

Et₂O抽出部の *n*-ヘキサン不溶部をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ベンゼン: AcOEt) でまず分離した。最初、ベンゼンのみで展開するとAQ-B-2 (9) のみが含まれる画分が溶出、AcOEt濃度を5%から30%に段階的に増しつつ展開すると、AQ-B-1 (8), AQ-B-3 (10), AQ-B-4 (11) を含む画分、AQ-C-1 (12), AQ-C-2 (13) を含む画分およびAQ-D (14) を含む画分が順次溶出した。

AQ-B-2 (9) の画分をベンゼンから再結晶し暗紫色プリズム晶, mp 199~200°C (収量, 380 mg) を得た。

AQ-B-1 (8), AQ-B-3 (10), AQ-B-4 (11) を含む画分は次にアルミナカラムクロマトグラフィー (ベンゼン: AcOEt (9:1 v/v)) に付したところ赤紫色のAQ-B-1 (8) が溶出し続いて赤色のAQ-B-3 (10) とAQ-B-4 (11) の混合した画分が得られた。

AQ-B-1 (8) を含む画分はベンゼンから再結晶し暗紫色プリズム晶, mp 208~209°C (収量, 290 mg) を得た。

AQ-B-3 (10) とAQ-B-4 (11) を含む画分をMeOHから再結晶しmp > 300°CのAQ-B-4 (11) の暗紫色プリズム晶 (収量, 72mg) を得た。再結晶母液を濃縮, 残渣をシクロヘキサンから再結晶しmp 148~150°CのAQ-B-3 (10) の赤紫色微細結晶 (収量, 120 mg) を得た。

AQ-C-1 (12) とAQ-C-2 (13) の混ざった画分をベンゼンから再結晶したところAQ-C-1 (12) が暗紫色プリズム晶として析出した。これを母液, 母液は濃縮後, 残渣をアルミナカラムクロマトグラフィー (ベンゼン: AcOEt (9:1 v/v)) に付した。まずAQ-C-1 (12) の紫色の画分が溶出し, 次にAQ-C-2 (13) の赤紫色の画分が溶出した。

AQ-C-1 (12) の画分をベンゼンから再結晶し暗紫色プリズム晶, mp 213~214°C (収量, 1.4g) を得た。

またAQ-C-2 (13) の画分をMeOHから再結晶し紫色針状晶, mp 202~203°C (収量, 150 mg) を得た。

AQ-D (14) を含む画分をアセトンから再結晶し暗紫色プリズム晶, mp > 300°C (収量, 150mg) を得た。本化合物は asterriquinone 類のうち最も有機溶媒に難溶で, 分離操作を行っている途中に析出することもあった。

AQ-B-1 (8) の性質

Anal. Calcd for C₃₄H₃₄N₂O₄: C, 76.38; H, 6.41; N, 5.24

Found: C, 76.13; H, 6.44; N, 4.97

MS m/z : 534 (M^+), 465, 396

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.52, 1.84 (each s, 2CH_3), 3.62 (2H, d, $J=7.5\text{ Hz}$), 3.72, 3.82 (each s, OCH_3), 5.14 (1H, dd, $J=10, 1\text{ Hz}$), 5.18 (1H, dd, $J=18, 1\text{ Hz}$), 5.20 (1H, t, $J=7.5\text{ Hz}$), 6.12 (1H, dd, $J=18.5, 10\text{ Hz}$), 7.00~7.58 (8H, m, aromatic H), 8.18, 8.60 (each s, NH)

AQ-B-2 (9) の性質

Anal. Calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_4$: C, 76.38 ; H, 6.41 ; N, 5.24

Found : C, 76.00 ; H, 6.36 ; N, 5.09

MS m/z : 534 (M^+), 465, 396

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.48 (6H, s), 1.86, 1.88 (each s, CH_3), 3.57 (2H, d, $J=8\text{ Hz}$), 3.67, 3.76 (each s, OCH_3), 5.09 (1H, dd, $J=10.5, 1\text{ Hz}$), 5.13 (1H, dd, $J=17.5, 1\text{ Hz}$), 5.42 (1H, t, $J=8\text{ Hz}$), 6.07 (1H, dd, $J=17.5, 10.5\text{ Hz}$), 6.97~7.58 (8H, m, aromatic H), 8.22, 8.63 (each s, NH)

AQ-B-3 (10) の性質

Anal. Calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4$: C, 74.66 ; H, 5.62 ; N, 6.01

Found : C, 74.55 ; H, 5.80 ; N, 6.07

MS m/z : 466 (M^+), 398, 69

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.37 (6H, s), 3.73, 3.75 (each s, OCH_3), 4.73 (1H, dd, $J=9.5, 1.5\text{ Hz}$), 4.93 (1H, dd, $J=17, 1.5\text{ Hz}$), 6.06 (1H, dd, $J=17, 9.5\text{ Hz}$), 7.05~7.69 (10H, m, aromatic H), 8.72 (1H, bs, NH)

AQ-B-4 (11) の性質

Anal. Calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_4$: C, 76.38 ; H, 6.41 ; N, 5.24

Found : C, 76.21 ; H, 6.18 ; N, 5.24

MS m/z : 534 (M^+), 465, 396, 69

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 1.55 (12H, s), 3.62 (s, 2OCH_3), 4.90~5.24 (4H, m), 6.18 (2H, dd, $J=17.5, 10.5\text{ Hz}$), 6.90~7.54 (8H, m, aromatic H), 11.08, 11.14 (each s, NH)

AQ-C-1 (12) の性質

Anal. Calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4$: C, 74.66 ; H, 5.62 ; N, 6.01

Found : C, 74.39 ; H, 5.70 ; N, 5.68

MS m/z : 466 (M^+), 397

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 1.46 (6H, s), 3.66, 3.71 (each s, OCH_3), 5.01 (1H, dd, $J=10, 1\text{ Hz}$), 5.05 (1H, dd, $J=18, 1\text{ Hz}$), 6.09 (1H, dd, $J=18, 10\text{ Hz}$), 6.94~7.62 (9H, m, aromatic H), 11.01, 11.57 (each s, NH)

AQ-C-2 (13) の性質

Anal. Calcd for $C_{29}H_{26}N_2O_4$: C, 74.66 ; H, 5.62 ; N, 6.01

Found : C, 74.57 ; H, 5.46 ; N, 5.70

MS m/z : 466 (M^+), 396, 206

1H -NMR (DMSO- d_6) δ : 1.78 (6H, s), 3.64 (2H, d, $J=7.5$ Hz), 3.80 (s, 2OCH₃), 5.50 (1H, t, $J=7.5$ Hz), 6.90~7.70 (9H, m, aromatic H), 11.56, 11.62 (each s, NH)

AQ-D (14) の性質

Anal. Calcd for $C_{24}H_{18}N_2O_4$: C, 72.35 ; H, 4.55 ; N, 7.03

Found : C, 72.28 ; H, 4.52 ; N, 7.29

MS m/z : 398 (M^+)

1H -NMR (acetone- d_6) δ : 3.77 (s, 2OCH₃), 6.95~7.65 (10H, m, aromatic H), 11.60 (s, 2NH)

A. terreus IFO 6346 の代謝産物の抽出, 単離

A. terreus IFO 6346 を *A. terreus* var. *africanus* IFO 8835 の場合と同様に培養した。培養後菌体を汙取, 温風乾燥した。この乾燥菌体 (35 g/6l 培養液) を粉碎しソックスレー抽出器で Et₂O 抽出。溶媒を留去し得られた残渣を蔦酸処理シリカゲルカラムに付しベンゼンで展開し赤紫色を呈する溶出液の分画を合せ濃縮する。この分画には2種の紫色色素が含まれていた。その濃縮残渣を preparative TLC (シリカゲル, ベンゼン) で分離。Rf 0.75 の赤紫色の分画を *n*-ヘキサンから再結晶し mp 110~113°C の AQ-E (15) の暗紫色微細結晶 (収量, 4mg) を得た。また Rf 0.50 の紫色の分画をベンゼンから再結晶し, mp 213~215°C の AQ-F (16) の暗紫色プリズム晶 (収量, 6mg) を得た。

AQ-E (15) の性質

Anal. Calcd for $C_{35}H_{34}N_2O_5$: C, 74.71 ; H, 6.09 ; N, 4.98

Found : C, 74.30 ; H, 6.09 ; N, 4.41

MS m/z : 564 (M^+), 522

IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹ : 3350, 1775, 1675

1H -NMR (acetone- d_6) δ : 1.71, 1.73 (each s, 2CH₃), 2.82 (s, OCOCH₃), 3.70 (4H, d, $J=7.4$ Hz), 3.73 (s, 2OCH₃), 5.39 (2H, t, $J=7.4$ Hz), 6.98~7.09 (4H, m, aromatic H), 7.30~7.42 (4H, m, aromatic H), 10.46, 10.48 (each bs, NH)

AQ-F (16) の性質

Anal. Calcd for $C_{34}H_{34}N_2O_4$: C, 76.38 ; H, 6.41 ; N, 5.24

Found : C, 76.51 ; H, 6.40 ; N, 5.55

MS m/z : 534 (M^+)

IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3770, 1660

$^1\text{H-NMR}$ (acetone- d_6) δ : 1.74 (s, 4 CH_3), 3.47 (4H, d, $J = 7.4 \text{ Hz}$), 3.73 (s, 2 OCH_3), 5.39 (2H, t, $J = 7.4 \text{ Hz}$), 6.98~7.40 (8H, m, aromatic H), 10.27 (bs, 2NH)

Asterriquinone 類の $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 還元および Zn 末還元

AQ-C-1 (12) を一例として記述する。

i) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 還元

12 (100mg) を Et_2O (100ml) にとかし, 1% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 水溶液とともに分液ロートで振盪。 Et_2O 層は赤紫色から黄色に変化した。 Et_2O 層を水洗後, Na_2SO_4 で乾燥。溶媒留去し得られる残渣をベンゼンから再結晶し mp 206~208°C, 無色針状の AQ-C-1 のキノール体 (73) を得た。

ii) Zn 末還元

12 (100mg) を氷酢酸 (10ml) にとかし Zn 末 (200mg) を加え, 反応液が無色となるまで加熱還流した。反応液を冷却し, Zn 末を汙別。汙液を減圧乾固し残渣をベンゼンから再結晶し無色微細針状のキノール体 (73) を得た。

Asterriquinone 類のキノール体の空気酸化および FeCl_3 酸化

AQ-C-1 のキノール体 (73) を一例として記述する。

73 (50mg) を MeOH (10ml) にとかし, 5% FeCl_3 水溶液 (5ml) を加え 10 分間攪拌した。反応液は黄褐色から暗紫色に変化した。これを水に注ぎ生ずる沈澱を汉取。ベンゼンから再結晶し暗紫色プリズム状の AQ-C-1 (12) を定量的に得た。

また, 73 を MeOH にとかし室温で 2 日放置したところ, AQ-C-1 (12) の生成が TLC で認められた。

AQ-D (14) から化合物 (82) の合成

i) AQ-D (14) の $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 還元

14 (100mg) を AcOEt (50ml) にとかし 1% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (100ml) とともに分液ロートで振盪。 AcOEt 層は赤紫色から黄色に変化した。 AcOEt 層を水洗, Na_2SO_4 で乾燥後濃縮。残渣をアセトンで洗浄し未変化体を除去し, mp > 300°C, 無色微細針状のキノール体 (85) (収量, 98mg) を得た。

IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3350, 1450, 1405

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 3.75 (s, 2 OCH_3), 6.65 (s, 2OH), 6.85~7.30 (10H, m, aromatic H), 11.24 (s, 2NH)

ii) AQ-D キノール体 (85) のメチル化

85 (50mg) を DMF (5ml) にとかし過剰の CH_2N_2 の Et_2O 溶液を加え一夜放置。溶媒を留去し残渣をアルミナカラムクロマトグラフィー (ベンゼン : AcOEt (4 : 1 v/v)) で精製し, さらに MeOH より再結晶し mp > 300°C の無色プリズム晶 (82) (収量, 19mg) を得た。

Demethyl AQ-C-1 (57) の DMSO/Ac₂O 酸化

57 (100 mg) を DMSO (1 ml) にとかし Ac₂O (1.5 ml) を加え 120°C で 4 分間加熱後、反応液を水に注ぎ生ずる沈澱を汙取。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付しベンゼンで展開し溶出する橙赤色の分画を合せ濃縮。残渣を CH₂Cl₂ より再結晶し橙赤色針状晶 (23), mp > 300°C (収量, 32 mg) を得た。

Anal. Calcd for C₂₇H₂₀N₂O₄: C, 74.30; H, 4.62; N, 6.42

Found: C, 74.02; H, 4.51; N, 6.31

MS *m/z*: 436 (M⁺)

UV λ_{max}^{EtOH} nm (log ε): 274 (sh), 283 (4.32), 290 (sh), 480 (4.22)

IR ν_{max}^{KBr} cm⁻¹: 3400, 3300, 1800, 1756, 1665

AQ-A-1 (4) の脱メチル化

4 をアセトンにとかし HCl と共に加熱還流したところ asterriquinone (1) を得た (詳細は第 3 節の実験の部で記述)。

Asterriquinone (1) のメチル化

1 (50 mg) を Et₂O にとかしこれに過剰の CH₂N₂ の Et₂O 溶液を加え室温で 10 分間放置。溶媒を留去し残渣を EtOH から再結晶し mp 168°C, 紫色針状の AQ-A-1 (4) (収量, 40 mg) を得た。

理論の部で述べたように asterriquinone 類 (AQ-A-1 (4) ~ AQ-D (14)) の構造決定に際し、まず Pd-C 下の接触還元により側鎖を飽和後 FeCl₃ 酸化し、次に脱メチル化を行い、最後に脱メチル体の H₂O₂ 酸化ならびに過酢酸酸化を行った。

これらの実験法はいずれの asterriquinone 類の場合も同様であったので、実験の部では一例のみを上げその方法を示し、その他については生成物の性質のみを示すこととした。

Asterriquinone 類の接触還元と酸化

AQ-B-1 (8) を一例として記述する。

8 (500 mg) を AcOEt (150 mg) にとかし 5% Pd-C を触媒として水素气流中振盪したところ、3 モルの水素を吸収し反応液は紫色から無色となった。触媒を汙別し汙液を減圧濃縮し粗キノール体を得た。これを精製せずにそのまま MeOH (20 ml) にとかし、5% FeCl₃ 水溶液を加え 10 分間攪拌したところ、反応液は黄褐色から暗紫色に変化した。これを水に注ぎ生ずる沈澱を汉取。MeOH から再結晶し AQ-HB-1 (30) の暗紫色プリズム晶, mp 255~257°C を定量的に得た。

他の asterriquinone 類を同様に処理して得た誘導体の性質を以下に記述する。

AQ-HA-2 (41)

暗紫色プリズム晶 (MeOH), mp 221~222°C

Anal. Calcd for $C_{39}H_{48}N_2O_4$: C, 76.94 ; H, 7.95 ; N, 4.60

Found : C, 76.84 ; H, 7.95 ; N, 4.74

1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 0.83 (3H, t, $J=7.2$ Hz), 1.00 (12H, t, $J=4.8$ Hz), 1.50~2.00 (8H, m), 2.80 (4H, t, $J=7.6$ Hz), 3.67, 3.77 (each s, OCH_3), 6.80~7.40 (7H, m, aromatic H), 7.87, 8.43 (each s, NH)

AQ-HA-3 (44)

暗紫色粉末 (*n*-ヘキサン), mp 228~231°C

Anal. Calcd for $C_{34}H_{38}N_2O_4$: C, 75.81 ; H, 7.11 ; N, 5.20

Found : C, 75.89 ; H, 6.92 ; N, 4.85

1H -NMR (acetone- d_6) δ : 0.67 (3H, t, $J=7.2$ Hz), 0.80 (3H, t, $J=7.2$ Hz), 1.35 (s, 2 CH_3), 1.77 (s, 2 CH_3), 1.79 (2H, q, $J=7.2$ Hz), 3.75 (s, 2 OCH_3), 6.70~7.77 (9H, m, aromatic H), 9.85 (s, 2NH)

AQ-HA-4 (46)

暗赤紫色プリズム晶 (MeOH), mp 267~270°C

Anal. Calcd for $C_{39}H_{48}N_2O_4$: C, 76.94 ; H, 7.95 ; N, 4.60

Found : C, 77.78 ; H, 7.84 ; N, 4.68

1H -NMR (acetone- d_6) δ : 0.84 (6H, t, $J=7$ Hz), 1.00 (6H, d, $J=6$ Hz), 1.46 (s, 4 CH_3), 1.75 (3H, m), 1.84 (4H, q, $J=7$ Hz), 2.96 (2H, t, $J=7.5$ Hz), 3.72 (s, 2 OCH_3), 6.95~7.40 (7H, m, aromatic H), 9.50, 10.40 (each s, NH)

AQ-HB-1 (30)

暗紫色プリズム晶 (MeOH), mp 255~257°C

Anal. Calcd for $C_{34}H_{38}N_2O_4$: C, 75.81 ; H, 7.11 ; N, 5.20

Found : C, 75.57 ; H, 7.15 ; N, 5.22

1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 0.83 (3H, t, $J=7.5$ Hz), 1.38, 1.48 (each s, CH_3), 1.01 (6H, d, $J=6$ Hz), 1.50~1.90 (5H, m), 2.90 (2H, t, $J=8$ Hz), 3.77, 3.83 (each s, OCH_3), 7.04~7.80 (8H, m, aromatic H), 8.26, 8.60 (each s, NH)

AQ-HB-2 (32)

暗紫色プリズム晶 (ベンゼン), mp 196~197°C

Anal. Calcd for $C_{34}H_{38}N_2O_4$: C, 75.81 ; H, 7.11 ; N, 5.20

Found : C, 76.06 ; H, 6.92 ; N, 5.12

1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 0.83 (3H, t, $J=8$ Hz), 1.00 (6H, d, $J=5.4$ Hz), 1.37 (s, 2 CH_3), 1.47~1.97 (5H, m), 2.80 (2H, t, $J=8$ Hz), 3.63, 3.73 (each s, OCH_3),

6.80 ~ 7.66 (8 H, m, aromatic H), 7.89, 8.87 (each s, NH)

AQ-HB-3 (35)

赤紫色粉末 (シクロヘキサン), mp 80 ~ 82°C

Anal. Calcd for $C_{29}H_{28}N_2O_4$: C, 74.34; H, 6.02; N, 5.98

Found: C, 74.62; H, 5.85; N, 6.50

1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 0.65 (3H, t, $J=7$ Hz), 1.70 (s, 2 CH_3), 2.17 (2H, q, $J=7$ Hz), 3.72, 3.75 (each s, OCH_3), 7.10 ~ 7.78 (10 H, m, aromatic H), 9.80 (1 H, bs, NH)

AQ-HB-4 (39)

暗紫色プリズム晶 (MeOH), mp > 300°C

Anal. Calcd for $C_{34}H_{38}N_2O_4$: C, 75.81; H, 7.11; N, 5.20

Found: C, 75.40; H, 7.01; N, 5.32

1H -NMR ($DMSO-d_6$) δ : 0.82 (6H, t, $J=7$ Hz), 1.46 (s, 4 CH_3), 3.90 (s, 2 OCH_3), 1.89 (4H, q, $J=7$ Hz), 6.89 ~ 7.35 (8 H, m, aromatic H), 10.10, 10.30 (each s, NH)

AQ-HC-1 (19)

暗紫色針状晶 (MeOH), mp 245 ~ 247°C

Anal. Calcd for $C_{29}H_{28}N_2O_4$: C, 74.34; H, 6.02; N, 5.98

Found: C, 74.26; H, 5.98; N, 5.75

1H -NMR ($DMSO-d_6$) δ : 0.82 (3H, t, $J=7$ Hz), 1.71 (2H, q, $J=7$ Hz), 1.47 (s, 2 CH_3), 3.66, 3.71 (each s, OCH_3), 6.95 ~ 7.71 (9H, m, aromatic H), 11.10, 11.58 (each s, NH)

AQ-HC-2 (24)

暗紫色鱗片状晶 (MeOH), mp 242 ~ 244°C

Anal. Calcd for $C_{29}H_{28}N_2O_4$: C, 74.34; H, 6.02; N, 5.98

Found: C, 74.49; H, 5.90; N, 6.61

1H -NMR ($DMSO-d_6$) δ : 0.98 (6H, d, $J=4.8$ Hz), 1.40 ~ 1.83 (3H, m), 2.87 (2H, t, $J=7.5$ Hz), 3.73 (s, 2 OCH_3), 6.83 ~ 7.63 (9H, m, aromatic H), 11.77 (s, 2NH)

イソブレン側鎖を飽和した Asterriquinone 類の脱メチル化

AQ-HB-1 (30) を一例として記述する。

30 (200 mg) を氷酢酸 (28 ml) にとかし 10% HBr (12 ml) を加え 1 時間加熱還流。反応液を水に注ぎ Et_2O 抽出し, Et_2O 層をさらに 10% Na_2CO_3 で抽出する。この抽出部を HCl 酸性とし Et_2O 抽出し, Et_2O 層は水洗後 Na_2SO_4 で乾燥し濃縮。残渣をベンゼンから再結晶して demethyl AQ-HB-1 (31) の暗紫色プリズム晶, mp 212 ~ 214°C (収量, 98 mg) を得た。

AQ-HA-3 (44) および AQ-HB-3 (35) の場合は, HBr のかわりに HCl を用いて脱メチル化を

行った(詳細については第3節の実験の部で記述した。)

以下にこのようにして得た脱メチル体の性質を示す。

Demethyl AQ-HA-2 (42)

暗紫色プリズム晶(ベンゼン), mp 190.5~192°C

Anal. Calcd for $C_{37}H_{44}N_2O_4$: C, 76.52; H, 7.64; N, 4.82

Found: C, 76.65; H, 7.69; N, 5.40

IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3475, 3400, 3350, 1630

Demethyl AQ-HA-3 (45)

暗緑色針状晶(ベンゼン), mp 268~274°C (dec.)

Anal. Calcd for $C_{32}H_{34}N_2O_4$: C, 75.27; H, 6.71; N, 5.49

Found: C, 75.41; H, 6.71; N, 5.27

IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3460, 3300, 1625

Demethyl AQ-HA-4 (47)

暗紫色プリズム晶(ベンゼン), mp 262~267°C

Anal. Calcd for $C_{37}H_{44}N_2O_4$: C, 76.52; H, 7.64; N, 4.82

Found: C, 76.56; H, 7.51; N, 4.20

IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3400, 3350, 1630

Demethyl AQ-HB-1 (31)

暗紫色プリズム晶(ベンゼン), mp 212~214°C

Anal. Calcd for $C_{32}H_{34}N_2O_4$: C, 75.27; H, 6.71; N, 5.49

Found: C, 75.33; H, 6.58; N, 5.35

IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3400, 3350, 1630

Demethyl AQ-HB-2 (33)

緑紫色針状晶(ベンゼン), mp 212~214°C

Anal. Calcd for $C_{32}H_{34}N_2O_4$: C, 75.27; H, 6.71; N, 5.49

Found: C, 75.67; H, 6.64; N, 5.41

IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3320, 1630

Demethyl AQ-HB-3 (36)

赤紫色針状晶(ベンゼン), mp 191~193°C

Anal. Calcd for $C_{27}H_{24}N_2O_4$: C, 73.62; H, 5.49; N, 6.36

Found: C, 73.51; H, 5.46; N, 5.96

IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3320, 1620

Demethyl AQ-HB-4 (40)

暗紫色プリズム晶(ベンゼン), mp 286~289°C

Anal. Calcd for $C_{32}H_{34}N_2O_4$: C, 75.27; H, 6.71; N, 5.49

Found: C, 74.94; H, 6.69; N, 5.15

IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3390, 3330, 1630

Demethyl AQ-HC-1 (20)

暗紫色針状晶 (ベンゼン), mp 240~242°C

Anal. Calcd for $C_{27}H_{24}N_2O_4$: C, 73.62; H, 5.49; N, 6.36

Found: C, 73.88; H, 5.42; N, 6.60

IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3400, 1630

Demethyl AQ-HC-2 (25)

暗紫色鱗片状晶 (MeOH), mp 262~265°C

Anal. Calcd for $C_{27}H_{24}N_2O_4$: C, 73.62; H, 5.49; N, 6.36

Found: C, 73.47; H, 5.44; N, 6.20

IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3400, 3350, 1615

Asterriquinone 類のアルカリ性 H_2O_2 酸化

Demethyl AQ-HB-1 (31) (100 mg) を 0.1 N NaOH (20 ml) にとかし 30% H_2O_2 (10 ml) を加え室温で 3 時間放置。反応液を HCl 酸性とし AcOEt 抽出。Na₂SO₄ で乾燥後濃縮し残渣を preparative TLC (シリカゲル, *n*-ヘキサン: AcOEt (1:1 v/v)) に付し, *R_f* 0.74, 0.63 および 0.34 の 3 帯に分離した。*R_f* 0.74 の部分をかきとり, 石油ベンジンから再結晶し無色針状晶 (27), mp 123~124°C (収量, 5 mg) を得た。

Anal. Calcd for $C_{12}H_{17}NO_2$: C, 69.54; H, 8.27; N, 6.76

Found: C, 69.47; H, 8.36; N, 6.76

MS *m/z*: 207 (*M*⁺), 151, 150, 133, 132, 105

UV λ_{\max}^{EtOH} nm (log ϵ): 246 (3.91), 336 (3.70)

IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3480, 3350, 3050~2500 (COOH), 2800, 1670

¹H-NMR (CCl₄) δ : 1.00 (6H, d, *J*=5 Hz), 1.16~1.87 (3H, m), 2.47 (2H, t, *J*=8 Hz), 6.43 (1H, dd, *J*=8, 7.2 Hz), 7.00 (1H, dd, *J*=7.2, 1.6 Hz), 7.70 (1H, dd, *J*=8, 1.6 Hz)

27 (56 mg) を 210°C で 15 分間加熱。反応物を冷却後, Et₂O に溶解し 1% NaOH および水で洗浄。Na₂SO₄ で乾燥後濃縮し黄褐色油状物質 (28) を得た。

高分解能-MS *m/z*: 163.2648 (Calcd for $C_{11}H_{17}N$ 163.2648)

28 を Ac₂O とともに 75°C で数分間加温。反応液を水に注ぎ Et₂O 抽出し Et₂O 層を 10% NaHCO₃ および水で洗浄後, Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去して得られる残渣を *n*-ヘキサンから再結晶し無色針状晶 (29), mp 98~99°C (収量, 35 mg) を得た。

Anal. Calcd for $C_{13}H_{19}NO$: C, 76.05; H, 9.33; N, 6.82

Found: C, 76.10; H, 9.44; N, 7.03

MS m/z : 205 (M^+), 162, 106

IR $\nu_{\max}^{KBr} \text{ cm}^{-1}$: 3380, 2880, 1650, 1535, 1530

本化合物は 2-(3-methylbutyl) acetanilide の標品との混融試験並びに IR, NMR スペクトルの比較により同定された。

R_f 0.63 の部分をかきとり石油エーテルから再結晶し無色針状晶 (21), mp 137~138°C (収量, 12 mg) を得た。

Anal. Calcd for $C_{13}H_{19}NO_3$: C, 66.36; H, 7.28; N, 5.95

Found: C, 66.26; H, 7.51; N, 5.85

MS m/z : 235 (M^+), 207, 189, 164, 139, 71

UV $\lambda_{\max}^{EtOH} \text{ nm} (\log \epsilon)$: 255 (3.15), 305 (2.62)

IR $\nu_{\max}^{KBr} \text{ cm}^{-1}$: 3150, 3100, 3000~2800, 1685, 1640, 1605, 1575

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.83 (3H, t, $J=7.5 \text{ Hz}$), 1.20 (s, 2 CH_3), 1.60 (2H, q, $J=7.5 \text{ Hz}$), 7.07 (1H, dd, $J=8, 7.2 \text{ Hz}$), 7.57 (1H, dd, $J=8.5, 7.2 \text{ Hz}$), 8.10 (1H, d, $J=8 \text{ Hz}$), 8.78 (1H, d, $J=8.5 \text{ Hz}$), 10.63 (bs, NH), 11.00 (bs, OH)

21 (30 mg) に 10% HCl (5 ml) を加え, N_2 気流中 100°C で 4 時間加熱。冷後, 反応液を pH 6.0 とし AcOEt 抽出。Na₂SO₄ で乾燥後濃縮し残渣を n -ヘキサンから再結晶し, mp 142~142°C, 無色微細結晶状の anthranilic acid (収量, 8 mg) を得た。

また R_f 0.43 の部分をかきとりベンゼンから再結晶し無色プリズム晶 (26), mp 195~197°C (収量, 5 mg) を得た。本物質は Ehrlich 反応陽性 (赤紫色) である。

Anal. Calcd for $C_{14}H_{17}NO_2$: C, 72.70; H, 7.41; N, 6.06

Found: C, 72.35; H, 7.15; N, 5.79

MS m/z : 231 (M^+)

UV $\lambda_{\max}^{EtOH} \text{ nm} (\log \epsilon)$: 213 (4.53), 287 (4.30)

IR $\nu_{\max}^{KBr} \text{ cm}^{-1}$: 3380, 3330, 1640

$^1\text{H-NMR}$ (acetone- d_6) δ : 0.93 (6H, d, $J=5 \text{ Hz}$), 1.33~1.87 (3H, m), 2.90 (2H, t, $J=7.5 \text{ Hz}$), 6.98 (1H, dd, $J=6.8, 3.2 \text{ Hz}$), 7.12 (1H, dd, $J=6.8, 6.8 \text{ Hz}$), 7.95 (1H, d, $J=3.2 \text{ Hz}$), 7.97 (1H, dd, $J=6.8, 3.2 \text{ Hz}$), 10.83 (bs, 2H)

Demethyl AQ-HC-2 (25) を上記と同様に処理し得られた生成物を preparative TLC (シリカゲル, n -ヘキサン: AcOEt (1:1 v/v) で分離。26 のほかに, R_f 0.25 の部分から indole-3-carboxylic acid (17) を得た。

Demethyl AQ-HB-2 (33), demethyl AQ-HB-3 (36), demethyl AQ-HC-1 (20) から 17 が得られた。

Demethyl AQ-HB-3 (**36**) の場合, **17** のほかに R_f 0.65 の部分から無色針状晶 (**37**), mp 152 ~ 153°C を得た。本品は 1-(1,1-dimethylpropyl) indole-3-carboxylic acid の標品と混融試験および IR スペクトルの比較により同定された。

Anal. Calcd for $C_{14}H_{17}NO_2$: C, 72.70; H, 7.41; N, 6.06

Found: C, 72.93; H, 7.45; N, 5.84

MS m/z : 231 (M^+)

UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ nm (log ϵ): 218 (4.49), 288 (4.10)

IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 2950, 1650, 1610

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.63 (3H, t, $J=7.2\text{ Hz}$), 1.73 (6H, s), 2.13 (2H, q, $J=7.2\text{ Hz}$), 7.07~8.13 (5H, m), 11.06 (1H, bs)

Asterriquinone 類の過酢酸酸化

Demethyl AQ-HB-2 (**33**) (100 mg) を氷酢酸 (5 ml) にとかし 30% H_2O_2 (1.6 ml) を加え室温で一晩放置した。反応液は赤紫色から黄褐色に変化した。反応液を水に注ぎ AcOEt 抽出。これを Na_2SO_4 で乾燥後濃縮し、残渣を石油エーテル抽出。抽出液を濃縮して得た残渣を preparative TLC (シリカゲル, n -ヘキサン: AcOEt (1:1 v/v)) に付した。 R_f 0.59 の部分をかきとり石油ベンジンから再結晶し mp 116~117°C の無色針状晶 (**34**) を得た。

Anal. Calcd for $C_{18}H_{27}NO_3$: C, 70.79; H, 8.91; N, 4.59

Found: C, 70.65; H, 8.91; N, 4.78

MS m/z : 207 (M^+)

UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ nm (log ϵ): 214 (4.40), 245 (sh, 3.90), 293 (3.56)

IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3300, 2940, 2900, 2850, 1700, 1655

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.90 (3H, t, $J=7.5\text{ Hz}$), 0.92 (6H, d, $J=5.4\text{ Hz}$), 1.32 (6H, s), 1.40~1.60 (3H, m), 1.68 (2H, $J=7.5\text{ Hz}$), 2.58 (2H, t, $J=7.6\text{ Hz}$), 7.24 (1H, dd, $J=8, 7.5\text{ Hz}$), 7.52 (1H, dd, $J=7.5, 2\text{ Hz}$), 7.84 (1H, dd, $J=8, 2\text{ Hz}$)

34 (10 mg) に 6N HCl (5 ml) を加え 8 時間加熱還流。反応液を AcOEt 抽出し AcOEt 層を Na_2SO_4 で乾燥後濃縮。残渣を preparative TLC (シリカゲル, n -ヘキサン: AcOEt (1:1 v/v)) に付した。 R_f 0.74 の部分を石油ベンジンから再結晶し無色針状の **27** (収量, 2 mg) を得た。

Demethyl AQ-HA-2 (**42**) (100 mg) を上記と同様に処理。反応生成物を preparative TLC (シリカゲル, n -ヘキサン: AcOEt (1:1 v/v)) で分離。 R_f 0.59 の部分から **34** (収量, 8 mg) を得た。このほか R_f 0.77 の部分をベンゼンから再結晶し mp 175~175.5°C の無色プリズム晶 (**43**) (収量, 5 mg) を得た。

Anal. Calcd for $C_{13}H_{15}NO_3$: C, 66.93; H, 6.48; N, 6.01

Found: C, 66.94; H, 6.43; N, 6.04

MS m/z : 233 (M^+), 187, 174, 161, 146

UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ nm ($\log \epsilon$): 240 (sh, 4.94), 322 (4.57)

IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3320, 3160, 1795, 1715, 1605, 1600

$^1\text{H-NMR}$ (acetone- d_6) δ : 0.97 (6H, d, $J=6\text{Hz}$), 1.43~1.93 (3H, m), 2.83 (2H, t, $J=7.6\text{Hz}$), 7.07 (1H, dd, $J=7.2, 7.2\text{Hz}$), 7.50 (1H, dd, $J=7.2, 2\text{Hz}$), 7.70 (1H, dd, $J=7.2, 2\text{Hz}$)

Demethyl AQ-HC-1 (20) および demethyl AQ-HB-4 (40) も同様に過酢酸酸化したところ、それぞれ 9% および 29% の収率で 21 が得られた。

また demethyl AQ-HA-4 (47) からは 21 と 34 が各々 10% と 11% の収率で得られた。

Demethyl AQ-HC-2 (25) からは 27 が収率 15% で得られた。

AQ-E (15) および AQ-F (16) の脱メチル化

15 (10mg) を EtOH (2ml) にとかし 1N NaOH (1ml) を加え 2 時間加熱還流。反応液を HCl 酸性とし Et₂O で抽出。Et₂O 層を水洗後 Na₂SO₄ で乾燥。濃縮後残渣をベンゼンから再結晶し mp 196~199°C の暗紫色微細結晶 (48) (収量, 5mg) を得た。

AQ-F (16) (10mg) からも上記と同様の処理により 48 (収量, 6mg) が得られた。

§ 第 3 節に関する実験

Asterriquinone 類の KOH による脱メチル化

AQ-B-2 (9) を一例とし記述する。

9 (100mg) を EtOH (20ml) にとかし, 1N KOH (10ml) を加え 1 時間加熱還流。EtOH を減圧留去, 残った水層部を HCl 酸性とし Et₂O 抽出。Et₂O 層をさらに 10% Na₂CO₃ で抽出し, Na₂CO₃ 層を HCl 酸性にして生ずる沈澱を濾取。これを蓚酸処理シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ベンゼン: AcOEt (9:1 v/v)) で精製, さらにベンゼンから再結晶し mp 192~195°C, 暗紫色微細結晶状の demethyl AQ-B-2 (54) (収率, 76%) を得た。

他の asterriquinone 類の場合も上記と同様に脱メチル化を行った。脱メチル体の性質を以下に示す。

Demethyl AQ-A-2 (50)

Anal. Calcd for C₃₇H₃₈N₂O₄: C, 77.32; H, 6.67; N, 4.87

Found: C, 77.60; H, 6.96; N, 4.65

IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3400, 3370, 3320, 1635

Demethyl AQ-A-3 (51)

Anal. Calcd for $C_{32}H_{30}N_2O_4$: C, 75.87 ; H, 5.97 ; N, 5.53

Found : C, 76.02 ; H, 5.85 ; N, 5.36

IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3310, 1630

Demethyl AQ-A-4 (52)

Anal. Calcd for $C_{37}H_{38}N_2O_4$: C, 77.32 ; H, 6.67 ; N, 4.87

Found : C, 77.43 ; H, 6.71 ; N, 4.77

IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3400, 3350, 1630

Demethyl AQ-B-1 (53)

Anal. Calcd for $C_{32}H_{30}N_2O_4$: C, 75.87 ; H, 5.97 ; N, 5.53

Found : C, 76.07 ; H, 5.93 ; N, 5.66

IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3400, 3300, 1630

Demethyl AQ-B-2 (54)

Anal. Calcd for $C_{32}H_{30}N_2O_4$: C, 75.87 ; H, 5.97 ; N, 5.53

Found : C, 75.47 ; H, 5.83 ; N, 5.35

IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3360, 3300, 1630

Demethyl AQ-B-3 (55)

Anal. Calcd for $C_{27}H_{22}N_2O_4$: C, 73.96 ; H, 5.06 ; N, 6.39

Found : C, 74.01 ; H, 4.97 ; N, 6.60

IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3380, 3300, 1630

Demethyl AQ-B-4 (56)

Anal. Calcd for $C_{32}H_{30}N_2O_4$: C, 75.87 ; H, 5.97 ; N, 5.53

Found : C, 75.37 ; H, 5.78 ; N, 5.68

IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3410, 3360, 3300, 1630

Demethyl AQ-C-1 (57)

Anal. Calcd for $C_{27}H_{22}N_2O_4$: C, 73.96 ; H, 5.06 ; N, 6.39

Found : C, 73.99 ; H, 4.86 ; N, 6.21

IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3380, 3300, 1635

Demethyl AQ-C-2 (58)

Anal. Calcd for $C_{27}H_{22}N_2O_4$: C, 73.96 ; H, 5.06 ; N, 6.39

Found : C, 74.18 ; H, 5.17 ; N, 6.34

IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3400, 3340, 1625

Demethyl AQ-D (59)

Anal. Calcd for $C_{22}H_{14}N_2O_4$: C, 71.35 ; H, 3.81 ; N, 7.56

Found : C, 71.22 ; H, 3.57 ; N, 7.79

IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3380, 3300, 1630

AQ-C-1 (12) の BBr_3 による脱メチル化

12 (300mg) を無水 CH_2Cl_2 (60 ml) にとかし, $-70 \sim -80^\circ\text{C}$ に冷却。これに BBr_3 (5.3 当量, CH_2Cl_2 (20 ml) にとかしたもの) を滴下した後, 1 時間放置。反応液を室温にもどし 1 時間放置後水に注ぎ Et_2O 抽出。この Et_2O 層をさらに 10% NaHCO_3 次に 10% Na_2CO_3 で抽出する。10% NaHCO_3 層を HCl 酸性とし生ずる沈澱を濾取。この部分からは demethyl AQ-C-1 (57) を収率 18% で得た。10% Na_2CO_3 層を HCl 酸性とし生ずる沈澱を濾取。ベンゼンから再結晶し暗紫色プリズム晶 (60), mp 154°C (収率, 32%) を得た。

Anal. Calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4$: C, 74.32 ; H, 5.35 ; N, 6.19

Found : C, 74.34 ; H, 5.52 ; N, 5.96

IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3380, 1645, 1625

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.52 (s, 2 CH_3), 3.82 (3H, s, OCH_3), 5.00 (1H, dd, $J=10$, 1 Hz), 5.10 (1H, dd, $J=18$, 1 Hz), 6.12 (1H, dd, $J=18$, 10 Hz), 7.01~7.55 (9H, m, aromatic H), 7.75 (1H, s, OH), 8.20, 8.55 (each bs, NH)

AQ-B-1 (8) の BBr_3 による脱メチル化

8 (100 mg) を AQ-C-1 (12) の場合と同様に BBr_3 で処理。反応液を Et_2O 抽出。 Et_2O 層をさらに 10% Na_2CO_3 および 0.1N NaOH で抽出する。 Na_2CO_3 抽出部から demethyl AQ-B-1 (53) (収率, 12%) を得た。 NaOH 層を HCl 酸性とし生ずる沈澱を濾取。これを蔞酸処理シリカゲル (ベンゼン : AcOEt (9 : 1 v/v)) で精製, さらにベンゼンから再結晶し mp $147 \sim 149^\circ\text{C}$ の紫色微細結晶 (61) (収率, 46%) を得た。

Anal. Calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_4$: C, 76.13 ; H, 6.20 ; N, 5.38

Found : C, 76.47 ; H, 6.21 ; N, 5.43

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.47 (6H, s), 1.80 (6H, s), 3.60 (2H, d, $J=6.4\text{Hz}$), 3.78 (3H, s), 5.10 (1H, dd, $J=9.6$, 1.6 Hz), 5.16 (1H, dd, $J=17.6$, 1.6 Hz), 5.43 (1H, t, $J=6.4\text{Hz}$), 6.13 (1H, dd, $J=17.6$, 9.6 Hz), 6.83~7.73 (8H, m), 7.90 (1H, s, OH), 8.10, 8.47 (each, bs, NH)

AQ-D (14) および AQ-B-3 (10) の BBr_3 による脱メチル化

14 (50 mg) を AQ-C-1 (12) の場合と同様に BBr_3 で処理。反応液を AcOEt で抽出しその AcOEt 層をさらに 10% NaHCO_3 で抽出する。10% NaHCO_3 層を HCl 酸性とし生ずる沈澱を濾取。沈澱を MeOH から再結晶し mp $> 300^\circ\text{C}$, 暗紫色針状の demethyl AQ-D (59) (収率, 50%) を得た。

10 (50 mg) も同様に BBr_3 で処理し, demethyl AQ-B-3 (55) (収率, 54%) を得た。

Asterriquinone 類の脱メチル化にともなうイソプレレン側鎖の脱離と転位

i) AQ-HA-3 (44) の脱メチル化

44 (100 mg) を氷酢酸 (7 ml) にとかし 10% HCl (3 ml) を加え 20 分間加熱還流。反応液を水に注ぎ Et_2O 抽出し, Et_2O 層をさらに 10% Na_2CO_3 で抽出する。 Na_2CO_3 層を HCl 酸性とし生ずる沈澱を濾取。これを蓚酸処理シリカゲルカラムクロマトグラフィーに付しベンゼンと AcOEt (10:1 v/v) で展開。紫色の第1分画をベンゼンから再結晶し mp 268~274°C, 暗緑色針状の demethyl AQ-HA-3 (45) (収率, 24%) を得た。続いて溶出する紫色の分画をベンゼンから再結晶し mp 240~242°C, 紫色針状の demethyl AQ-HC-1 (20) (収率, 57%) を得た。

ii) AQ-HB-3 (35) の脱メチル化

35 を上記と同様に処理し demethyl AQ-HB-3 (36) (収率, 20%) と demethyl AQ-D (59) (収率, 3%) を得た。

iii) AQ-A-1 (4) の脱メチル化

4 (250 mg) をアセトン (14 ml) にとかし 10% HCl (7 ml) を加え 8 時間加熱還流。反応液を水に注ぎ Et_2O 抽出し, Et_2O 層を 10% NaHCO_3 次に 10% Na_2CO_3 で抽出する。 NaHCO_3 抽出部を HCl 酸性とし, 生ずる沈澱を濾取。これを蓚酸処理シリカゲルカラムクロマトグラフィーに付しベンゼンと AcOEt (10:1 v/v) の混合溶媒で展開する。最初に溶出する赤紫色の分画を MeOH から再結晶し mp 222~224°C (dec.), 紫色針状の demethyl AQ-B-3 (55) (収率, 22%) を得た。続いて溶出する紫色の分画をベンゼンから再結晶し mp 212~214°C (dec.) の紫色微細結晶 (62) (収率, 5%) を得た。最後に溶出する赤紫色の分画を MeOH から再結晶し mp > 300°C, 暗紫色針状の demethyl AQ-D (59) (微量) を得た。

化合物 (62) の性質

Anal. Calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4$: C, 73.96; H, 5.06; N, 6.39

Found: C, 73.83; H, 5.06; N, 6.34

MS m/z : 438 (M^+), 371

$^1\text{H-NMR}$ (acetone- d_6) δ : 1.67 (6H, s), 3.45 (2H, d, $J=7\text{ Hz}$), 5.34 (1H, t, $J=7\text{ Hz}$), 6.83~7.60 (9H, m, aromatic H), 9.25 (2H, bs, 2OH), 9.98 (1H, bs, NH), 10.40 (1H, bs, NH)

Na_2CO_3 抽出部を蓚酸処理シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ベンゼン) で精製。さらに MeOH から再結晶し暗紫色針状の demethyl AQ-A-1 (= asterriquinone (1)) (収率, 21%) を得た。

iv) AQ-B-3 (10) の脱メチル化

10 (320 mg) をアセトン (20 ml) にとかし 10% HCl (9 ml) を加え 5 時間加熱還流。反応液を水に注ぎ Et_2O 抽出し, Et_2O 層を 10% NaHCO_3 で抽出する。 NaHCO_3 抽出部は AQ-A-1 (4) の場合と

同様に分離し demethyl AQ-B-3 (**55**) (収率, 23%), 化合物(**62**) (収率, 11%) および demethyl AQ-D (**59**) (収率, 24%) を得た。

V) Asterriquinone (**1**) の側鎖の転位

1 (300mg) を氷酢酸 (60ml) にとかし c·HCl (6ml) を加え室温で 5 分間放置。反応液を水に注ぎ、生ずる沈澱を汙取。これを酢酸処理シリカゲルカラムクロマトグラフィーに付しベンゼンで展開し、溶出する紫色の部分 MeOH から再結晶し暗紫色針状の **1** (9.7%) を回収した。次にベンゼンと AcOEt (19:1 v/v) の混合溶媒で展開し、まず最初に溶出する紫色部分をシクロヘキサンから再結晶し mp 164~165°C の紫色微細結晶 (**66**) (収率, 36%) を得た。

Anal. Calcd for $C_{32}H_{30}N_2O_4$: C, 75.87; H, 5.97; N, 5.53

Found: C, 75.73; H, 6.10; N, 5.29

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.73 (6H, s), 1.80 (6H, s), 3.40 (2H, d, $J=7\text{Hz}$), 5.16 (1H, d, $J=18\text{Hz}$), 5.21 (1H, d, $J=10\text{Hz}$), 5.32 (1H, t, $J=7\text{Hz}$), 6.18 (1H, dd, $J=18, 10\text{Hz}$), 6.94~7.71 (8H, m, aromatic H), 7.14 (1H, s, 2-H of indole), 8.01 (3H, bs, 2OH and NH)

続いて溶出する紫色部分をベンゼンから再結晶し mp 196~199°C の暗紫色微細結晶 (**48**) (収率, 30%) を得た。

Anal. Calcd for $C_{32}H_{30}N_2O_4$: C, 75.87; H, 5.97; N, 5.53

Found: C, 75.71; H, 5.94; N, 5.66

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.75 (6H, s), 1.79 (6H, s), 3.41 (4H, d, $J=8\text{Hz}$), 5.33 (2H, t, $J=8\text{Hz}$), 6.95~7.36 (8H, m, aromatic H), 7.89 (2H, bs, OH), 8.07 (2H, bs, NH)

化合物 (**62**) の酸化

i) アルカリ性での H_2O_2 酸化

62 (40mg) を 0.1N NaOH (10ml) にとかし 30% H_2O_2 (5ml) を加え室温で 25 分間放置後、反応液を HCl 酸性とし Et_2O 抽出。 Et_2O 層を Na_2SO_4 で乾燥後濃縮し、残渣を preparative TLC (シリカゲル, CHCl_3 : AcOEt (2:1 v/v)) に付した。Rf 0.45 の部分をかきとり石油ベンジンから再結晶し mp 173~174°C の無色針状晶 (**65**) (収量, 1.5mg) を得た。

Anal. Calcd for $C_{14}H_{15}\text{NO}_2$: C, 73.34; H, 6.59; N, 6.11

Found: C, 72.92; H, 6.43; N, 5.93

MS m/z : 229 (M^+), 214

UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 217 (4.41), 255 (4.25), 295 (3.74)

IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3360, 3100~2800 (COOH), 1650

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.76 (s, 6H), 3.96 (2H, d, $J=6.8\text{Hz}$), 5.45 (1H, t, $J=6.8\text{Hz}$), 7.04~7.40 (3H, m, aromatic H), 8.05~8.33 (2H, m, aromatic H), 10.60 (1H, s, NH)

また R_f 0.2 の部分からは indole-3-carboxylic acid (17) を得た。

ii) 過酢酸酸化

62 (150 mg) を AcOEt (100 ml) にとかし 10% Pd-C 存在下水素気流中で振盪した。2 モルの水素を吸収し反応液が無色になった時点で触媒を濾去し、濾液を濃縮した。この過程で反応液は再び紫色に変化した。残渣をベンゼンから再結晶して mp 219~221°C (dec.) の dihydro 体 (63) の紫色微細結晶を得た。

Anal. Calcd for $C_{27}H_{24}N_2O_4$: C, 73.62; H, 5.49; N, 6.36

Found: C, 73.87; H, 5.47; N, 6.66

63 (150 mg) を氷酢酸 (8 ml) にとかし 30% H_2O_2 (15 ml) を加え室温で一日放置。反応液を水に注ぎ AcOEt 抽出。 Na_2SO_4 で乾燥後濃縮し残渣を石油ベンジンで抽出。可溶部の濃縮残渣を preparative TLC (シリカゲル, n -ヘキサン: AcOEt (1:1 v/v)) で精製, さらに石油ベンジンから再結晶し mp 82~83°C の無色針状晶 (64) (収量, 23 mg) を得た。

Anal. Calcd for $C_{13}H_{17}NO_3$: C, 66.36; H, 7.28; N, 5.95

Found: C, 66.25; H, 7.34; N, 5.88

MS m/z : 235 (M^+)

UV λ_{max}^{EtOH} nm: 217, 258, 283, 288 (sh)

IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3350, 3100, 2950~2800 (COOH), 1690, 1645, 1605, 1580

1H -NMR (CCl_4) δ : 0.97 (6H, d, $J=2.8$ Hz), 1.50~2.00 (3H, m), 2.45 (2H, t, $J=3.6$ Hz), 6.97 (1H, ddd, $J=7.2, 7, 2$ Hz), 7.46 (1H, ddd, $J=8, 7, 1$ Hz), 7.99 (1H, dd, $J=7.2, 1$ Hz), 8.65 (1H, dd, $J=8, 2$ Hz), 10.35 (1H, s, NH), 11.07 (1H, s, OH)

64 (10 mg) を 21 の場合と同様に HCl で加水分解したところ mp 142~144°C, 無色微細結晶状の anthranilic acid (4 mg) が得られた。

Asterriquinone 類の脱メチル化にともなうイソブレン側鎖の水和と環化

i) AQ-B-1 (8) の脱メチル化

8 (300 mg) を氷酢酸 (15 ml) にとかし 8% HCl (9 ml) を加え 15 分間加熱還流。反応液を水に注ぎ Et_2O 抽出し, Et_2O 層をさらに 10% $NaHCO_3$ 次に 10% Na_2CO_3 で抽出。 $NaHCO_3$ 層を HCl 酸性とし生ずる沈澱を濾取し, MeOH から結晶して mp 206~208°C の緑紫色針状晶 (67) (収率, 23%) を得た。

Anal. Calcd for $C_{32}H_{32}N_2O_5$: C, 73.26; H, 6.15; N, 5.34

Found: C, 72.92; H, 6.07; N, 5.17

MS m/z : 524 (M^+), 506

IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3500, 3400, 3325, 1630

1H -NMR (acetone- d_6) δ : 1.30 (s, 2 CH_3), 1.53 (s, 2 CH_3), 1.90 (2H, m), 3.10 (2H,

m), 3.50 (1H, bs, OH), 4.80 (1H, dd, $J=10$, 1.6 Hz), 4.90 (1H, dd, $J=17.6$, 1.6 Hz), 6.03 (1H, dd, $J=17.6$, 1.0 Hz), 6.70~7.50 (8H, m, aromatic H), 9.00 (2H, bs, 2 OH), 9.83, 10.33 (each s, indole NH)

Na_2CO_3 層も同様に HCl 酸性とし、生ずる沈澱を汙取。これを蔞酸処理シリカゲルカラムクロマトグラフィーに付しベンゼンと AcOEt (10:1 v/v) の混合溶媒で展開。最初に溶出する紫色の分画を MeOH から再結晶し mp 242~243℃ の暗紫色針状晶 (70) (収率, 10%) を得た。

Anal. Calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_4$: C, 75.87 ; H, 5.97 ; N, 5.53

Found : C, 76.05 ; H, 5.88 ; N, 5.38

MS m/z : 506 (M^+)

IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3400, 3300, 1630

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.47 (s, 2 CH_3), 1.53 (s, 2 CH_3), 2.03 (2H, t, $J=6$ Hz), 3.00 (2H, t, $J=6$ Hz), 5.00 (1H, dd, $J=10$, 1 Hz), 5.05 (1H, dd, $J=17.6$, 1.6 Hz), 6.03 (1H, dd, $J=17.6$, 10 Hz), 6.83~7.57 (8H, m, aromatic H), 7.98 (s, 2 OH), 8.47 (1H, bs, NH)

次に溶出する紫色の分画をベンゼンから再結晶し暗紫色プリズム状の demethyl AQ-B-1 (53) (収率, 20%) を得た。

ii) AQ-B-2 (9) の脱メチル化

9 を上記と同様に処理し, 10% NaHCO_3 抽出部を MeOH から再結晶し mp 236~238℃ の暗緑色針状晶 (69) (収率, 46%) を得た。また 10% Na_2CO_3 抽出部から demethyl AQ-B-2 (54) (収率, 29%) を得た。

化合物 (69) の性質

Anal. Calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_5$: C, 73.26 ; H, 6.15 ; N, 5.34

Found : C, 72.31 ; H, 6.03 ; N, 5.15

MS m/z : 524 (M^+), 506, 438

IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3500, 3300, 1630

$^1\text{H-NMR}$ (acetone- d_6) δ : 1.30 (s, 2 CH_3), 1.46 (s, 2 CH_3), 1.85 (2H, m), 2.95 (2H, m), 3.82 (bs, OH), 4.92 (1H, dd, $J=17.5$, 1.5 Hz), 4.97 (1H, dd, $J=10$, 1.5 Hz), 6.13 (1H, dd, $J=17.5$, 10 Hz), 6.70~7.70 (8H, m, aromatic H), 9.17 (2H, s, OH), 9.70, 10.37 (each s, NH)

iii) AQ-C-2 (13) の脱メチル化

13 を AQ-B-1 (8) の場合と同様に処理し, 10% NaHCO_3 抽出部をベンゼンから再結晶し mp 251~252℃ の暗赤色微細結晶 (68) (収率, 41%) を得た。

Anal. Calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5$: C, 71.04 ; H, 5.30 ; N, 6.10

Found : C, 72.20 ; H, 5.46 ; N, 5.86

MS m/z : 456 (M^+), 438

IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3500, 3390, 3260, 1625

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 1.12 (s, 2 CH_3), 1.88 (2H, m), 2.87 (2H, m), 3.50 (bs, OH), 6.67~7.50 (9H, m, aromatic H), 9.50 (2H, bs, OH), 11.03, 11.20 (each s, NH)

また10% Na_2CO_3 抽出部は蔞酸処理シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ベンゼン: AcOEt (9:1 v/v)) で分離精製し, 最初の紫色の部分をベンゼンから再結晶し mp 259~261°C の暗赤色微細結晶 (71) (収率, 15%) を得た。続いて溶出する紫色の画分を MeOH から再結晶し暗赤紫色針状の demethyl AQ-C-2 (58) (収率, 33%) を得た。

化合物 (71) の性質

Anal. Calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4$: C, 73.96; H, 5.06; N, 6.39

Found: C, 74.06; H, 4.98; N, 6.11

MS m/z : 438 (M^+)

IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3350, 1620

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 1.42 (s, 2 CH_3), 1.92 (2H, t, $J=5.2\text{Hz}$), 2.87 (2H, t, $J=5.2\text{Hz}$), 6.66~7.70 (9H, m, aromatic H), 10.50 (2H, bs, OH), 11.12 (1H, s, NH)

§ 第4節に関する実験

[1- ^{14}C] Indolepyruvic acid の合成

E. C. Wagner らの方法³⁹⁾を用いた。

[1- ^{14}C] Glycine と KOCN から [^{14}C] hydantoin を合成し, 本品と indolealdehyde を縮合して indolehydantoin に導き, これを加水分解し [1- ^{14}C] indolepyruvic acid (収率, 40%; 比放射活性, $2.71 \times 10^5 \text{ dpm/mg}$) を得た。

Dimethylallylpyrophosphate (DMAPP) の調製法

Methylcrotonic acid を LiAlH_4 で還元して methyl but-2-ene-1-ol を合成し, これを原料として A. A. Kandutch らの方法⁴⁰⁾を用い DMAPP を調製した。

粗酵素の調製法

すべての操作は 4°C で行った。また緩衝液としてはトリス緩衝液に 2-mercaptoethanol および MgCl_2 を各々 10mM, グリセリン 10% v/v 濃度になるように加えたものを用いた。

培養 6 日から 7 日目の菌体 (20 g) を収穫, 沓紙で湿気を取った後, 海砂 (20 g), PVP (4 g), 0.01M トリス緩衝液 (pH 7.0, 60ml) とともに乳鉢中で摩砕し, ホモジネートを $12,000 \times g$ で 30 分

間遠心分離した。次に上清部について30～60%飽和硫酸分画を行った後12,000×gで30分間遠心し沈澱を集めた。この沈澱を少量の緩衝液にとかしSephadex G-25 (30×1.5 cm) カラムクロマトグラフィーに付し上記の緩衝液で展開し、たんぱく質分画を集めた。これを100,000×gで60分間超遠心分離し上清を粗酵素として用いた。

プレニル化に用いる粗酵素の調製には、緩衝液として0.05M トリス緩衝液(pH7.5)を用い、また硫酸分画は30～75%飽和で行った。

酵素活性の検出法

i) 縮合活性の検出法

[1-¹⁴C] Indolepyruvic acid (1mg) をDMSO (0.5ml) にとかし0.1M トリス緩衝液(pH 8.2)を加え2.0mlとし、これにATP (15mg) および先に調製した粗酵素液(4ml)を加え30℃で3時間インキュベートした。反応液をHCl酸性としEt₂O抽出し、Et₂O層をCH₂N₂でメチル化後溶媒を留去。残渣をシリカゲルTLC (ベンゼン: AcOEt (3:1 v/v)) に付し、生成物をUVランプ下またはラジオクロマトスキャンナーで検出した。

ii) プレニル化活性の検出法

AQ-B-1 (8), AQ-B-2 (9), AQ-B-3 (10), AQ-C-1 (12), AQ-C-2 (13), AQ-D (14) およびこれらの脱メチル体を基質(最終濃度, 1.0mM)とし、それぞれDMSO (0.2ml) にとかし0.05M トリス緩衝液(pH8.2)を加え2.0mlとした。これにDMAPP (最終濃度, 2mM), KF (最終濃度, 10mM) および粗酵素液(5ml)を加え30℃で3時間インキュベートした。反応液をHCl酸性としEt₂O抽出し、溶媒を留去し残渣をシリカゲルTLC (ベンゼン: AcOEt) で分離し酵素生成物の検索を行った。(基質が脱メチル体の場合は酢酸処理シリカゲルを用いた。)

いずれの反応においても熱処理失活(100℃, 10分間)させた酵素を用いた場合と比較し反応生成物の検索を行った。

縮合酵素反応生成物の単離, 同定

Indolepyruvic acid (40mg) をDMSO (10ml) にとかし0.1M トリス緩衝液(pH8.2)を加え50mlとし、これにATP (300mg) および粗酵素液(180ml, 300gの菌体から調製した)を加え30℃で4時間インキュベートした。反応液をEt₂O抽出し、Et₂O層をNa₂SO₄で乾燥後濃縮し、残渣を酢酸処理シリカゲル preparative TLC (ベンゼン: AcOEt (3:1 v/v)) に付した。Demthyl AQ-D (59) と同じR_f値を示す赤紫色の部分をかきとりMeOHから再結晶しmp>300℃の紫色針状晶(収量, 4mg)を得た。本物質はdemethyl AQ-D (59)の標品とTLCおよびIR, UVスペクトルの比較により同定された。

DL-[3-¹⁴C] Tryptophan の投与実験

培養開始後7日目の菌蓋 (Roux flask 5本) の下へ DL-[3-¹⁴C] tryptophan (50 μ Ci) を滅菌蒸留水にとかした溶液を分注し、さらに10日間培養を続けた後、第1節で記述した方法で asterriquinone 類を分離、精製した。なお、各代謝産物の生産量、放射活性は逆希釈法によって求めた。

培養日数とAsterriquinone 類の生産量の関係

培養開始後4日、6日、8日、10日、12日、14日目に菌体 (Roux flask 5本分) を収穫し、それぞれについて asterriquinone 類の分離、精製を行った。精製した各 asterriquinone 類の吸光度を測定しこれら代謝産物の生成量を求めた。

第2章に関する実験

§ 第1節に関する実験

代謝産物の単離

第1章で記述した asterriquinone 類のクロマトグラフィーによる分離の際、AQ-ol-I (72) および AQ-ol-II (73) はそれぞれ AQ-A-1 (4) および AQ-C-1 (12) と同じ分画に溶出した。また、代謝産物Ⅲ (74)、代謝産物Ⅳ (75) および代謝産物Ⅴ (76) はそれぞれ AQ-A-1 (4) と AQ-A-2 (5) の間、AQ-A-3 (6) と AQ-A-4 (7) の間、AQ-B-3 (10) と AQ-B-4 (11) の間に溶出してきた。

AQ-ol-I (72) または AQ-ol-II (73) が含まれるそれぞれの分画をベンゼン抽出し紫色色素を除き、残渣をベンゼンから繰り返し再結晶し mp 242~245°C、無色針状の AQ-ol-I (72) および mp 206~208°C、無色針状の AQ-ol-II (73) をそれぞれ純粋に得た。

代謝産物Ⅲ (74)、代謝産物Ⅳ (75) および代謝産物Ⅴ (76) が含まれる分画について preparative TLC (アルミナ, CHCl_3) による分離、さらには MeOH からの再結晶を繰り返し、それぞれ mp 158~159°C、無色柱状の代謝産物Ⅲ (74)、mp 202~204°C、無色プリズム状の代謝産物Ⅳ (75)、および mp 226~228°C、無色針状晶の代謝産物Ⅴ (76) を得た。

代謝産物Ⅶ~Ⅹ (77~80) は AQ-D (14) が溶出した後 AcOEt 濃度 30%~50% で溶出する分画に存在した。これら代謝産物のクロマトグラフィーによる単離、精製については理論の部で述べた。代謝産物Ⅶ (77) は CCl_4 から再結晶し mp 134~138°C の淡黄色微細結晶として、また代謝産物Ⅷ (78) はベンゼンから再結晶し mp 131~140°C の淡黄色微細結晶として得た。代謝産物Ⅸ (79) と代謝産物Ⅹ (80) はいずれも MeOH から再結晶し前者は mp 221~222°C の無色針状晶として、後者は mp 141~143°C の無色針状晶として得た。

AQ-ol-I (72) の性質

Anal. Calcd for $C_{34}H_{36}N_2O_4$: C, 76.09 ; H, 6.76 ; N, 5.22

Found : C, 76.76 ; H, 6.74 ; N, 5.37

IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3400, 2950, 1455, 1415

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.78 (s, 4 CH_3), 3.33 (s, 2 OCH_3), 5.10 (2H, d, $J=17.6\text{ Hz}$), 5.32 (2H, d, $J=10.4\text{ Hz}$), 5.47 (2H, s, 2OH), 6.17 (2H, dd, $J=17.6, 10.4\text{ Hz}$), 6.90~7.67 (10 H, m, aromatic H)

AQ-ol-I (72) の FeCl_3 酸化

72 (10 mg) を MeOH (5 ml) にとかし 5% FeCl_3 (5 ml) を加え室温で 10 分間攪拌後、反応液を水に注ぎ Et_2O 抽出。 Et_2O 層を水洗し Na_2SO_4 で乾燥後濃縮、残渣を MeOH から再結晶し暗赤紫色針状の AQ-A-1 (4) (収量, 9 mg) を得た。

AQ-A-1 (4) の $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 還元

4 (150 mg) を Et_2O (100 ml) にとかし、1% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 水溶液 (100 ml) とともに分液ロートで振盪したところ Et_2O 層は赤紫色から黄色に変化した。 Et_2O 層を水洗し Na_2SO_4 で乾燥後濃縮。残渣をベンゼンから再結晶し無色針状の AQ-ol-I (72) (収量, 145 mg) を得た。

AQ-ol-II (73) の性質

Anal. Calcd for $C_{29}H_{28}N_2O_4$: C, 74.34 ; H, 6.02 ; N, 5.98

Found : C, 74.14 ; H, 6.10 ; N, 6.09

IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3500, 3450, 1450

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.38, 1.45 (each s, CH_3), 3.37 (s, 2 OCH_3), 4.98 (1H, dd, $J=10.4, 1.2\text{ Hz}$), 5.07 (1H, dd, $J=17.2, 1.2\text{ Hz}$), 5.37 (2H, s, 2OH), 6.05 (1H, dd, $J=17.2, 10.4\text{ Hz}$), 7.20~7.85 (9H, m, aromatic H), 8.00, 8.23 (each s, NH)

AQ-ol-I (73) の FeCl_3 酸化

73 を AQ-ol-I (72) の場合と同様に処理。ベンゼンから再結晶し暗紫色プリズム状の AQ-C-1 (12) を得た。

AQ-C-1 (12) の $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 還元

12 を AQ-A-1 (4) の場合と同様に $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ で処理。ベンゼンから再結晶し無色針状の AQ-ol-II (73) を得た。

代謝産物Ⅲ (74) の性質および合成

Anal. Calcd $C_{36}H_{40}N_2O_4$: C, 76.56 ; H, 7.14 ; N, 4.96

Found : C, 76.59 ; H, 7.00 ; N, 4.70

IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 2950, 2900, 1450

1H -NMR : Table 7 参照

AQ-ol-I (72) (50 mg) を少量の MeOH にとかしこれに過剰の CH_2N_2 の Et_2O 溶液を加え一夜放置。溶媒を留去し残渣を MeOH から再結晶し無色柱状の AQ-ol-Ⅲ (74) (収量, 33 mg) を得た。

代謝産物Ⅳ (75) の性質および合成

Anal. Calcd for $C_{31}H_{32}N_2O_4$: C, 74.97 ; H, 6.50 ; N, 5.64

Found : C, 75.07 ; H, 6.51 ; N, 5.56

IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3400, 2950, 2900, 1450

1H -NMR : Table 7 参照

AQ-B-3 (10) を AQ-A-1 (4) の場合と同様に $Na_2S_2O_4$ 還元し, 反応産物をベンゼンから再結晶し mp 249~251°C, 無色プリズム状の 10 のキノール体を得た。

Anal. Calcd for $C_{29}H_{28}N_2O_4$: C, 74.34 ; H, 6.02 ; N, 5.98

Found : C, 74.28 ; H, 6.10 ; N, 6.01

10 のキノール体を代謝産物Ⅲ (74) の合成の場合と同様に CH_2N_2 でメチル化し代謝産物Ⅳ (75) を得た。

代謝産物Ⅴ (76) の性質および合成

Anal. Calcd for $C_{31}H_{32}N_2O_4$: C, 74.97 ; H, 6.50 ; N, 5.64

Found : C, 74.77 ; H, 6.32 ; N, 5.54

IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3350, 2900, 1450

1H -NMR : Table 7 参照

AQ-C-2 (13) を $Na_2S_2O_4$ 還元し, 反応生成物を $CHCl_3$ から再結晶し mp 244~247°C, 無色微細結晶状の 13 のキノール体を得た。

Anal. Calcd for $C_{29}H_{28}N_2O_4$: C, 74.34 ; H, 6.02 ; N, 5.98

Found : C, 74.60 ; H, 5.93 ; N, 5.95

13 のキノール体を CH_2N_2 でメチル化し代謝産物Ⅴ (76) を得た。

代謝産物Ⅶ (77) の性質

淡黄色微細結晶 (CCl_4), mp 134~138°C

Anal. Calcd for $C_{25}H_{22}N_2O_5$: C, 69.75 ; H, 5.15 ; N, 6.51

Found : C, 68.90 ; H, 4.98 ; N, 6.51

MS m/z : 430 (M^+), 412, 397

UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ nm (log ϵ) : 223 (4.67), 284 (4.23), 291 (4.25), 310 (sh, 4.10)

IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3400, 3350, 1610, 1465

$^1\text{H-NMR}$ (acetone- d_6) δ : 3.31, 3.52, 4.08 (each s, OCH_3), 5.30 (1H, s, OH), 6.20 (1H, d, $J=3.7\text{ Hz}$), 6.45 (1H, d, $J=3.7\text{ Hz}$, NH), 6.68~7.78 (9H, m, aromatic H), 10.34 (1H, s, NH)

$[\alpha]_{\text{D}}^{18} + 34.3^\circ$ ($c=0.11$, EtOH)

代謝産物Ⅷ (77) の LiAlH_4 還元

77 (70 mg) を THF (5 ml) にとかし LiAlH_4 (200 mg) を加え 2.5 時間加熱還流。反応液を HCl 酸性とし AcOEt 抽出し, AcOEt 層は水洗し Na_2SO_4 で乾燥後濃縮。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ベンゼン : AcOEt (5 : 1 v/v)) で精製, さらに EtOH から再結晶し mp 285~288°C (dec.) の無色プリズム晶 (81) (収量, 31 mg) を得た。

Anal. Calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4$: C, 72.45 ; H, 5.35 ; N, 6.76

Found : C, 72.37 ; H, 5.22 ; N, 6.81

UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ nm (log ϵ) : 227 (4.86), 284 (4.39), 291 (4.39)

IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3380, 3440, 1450

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 3.61, 3.69, 3.73 (each s, OCH_3), 6.80~7.40 (10H, m, aromatic H), 8.00 (1H, s, phenolic OH), 10.54 (2H, bs, NH)

化合物 (81) のメチル化

81 (50 mg) を THF (3 ml) と MeOH (15 ml) の混合溶液にとかし, これに過剰の CH_2N_2 の Et_2O 溶液を加え 1 日放置。溶媒を留去し残渣を MeOH から再結晶し, mp $> 300^\circ\text{C}$ の無色プリズム晶 (82) (収量, 43 mg) を得た。

Anal. Calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4$: C, 72.88 ; H, 5.65 ; N, 6.54

Found : C, 72.91 ; H, 5.59 ; N, 6.59

MS m/z : 428 (M^+)

UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ nm (log ϵ) : 224 (4.89), 286 (4.43), 291 (4.45)

IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3340, 3260, 1455

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 3.44 (s, 4 OCH_3), 6.80~7.40 (10H, m, aromatic H), 11.27 (2H, bs, NH)

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ : Table 2 参照

代謝産物Ⅵ (77) のアセチル化

77 (50 mg) を pyridine (1 ml) にとかし Ac_2O (1 ml) を加え室温で一夜放置。反応液を水に注ぎ Et_2O 抽出し, Et_2O 層は 10% HCl , 10% NaHCO_3 さらに水で洗浄し Na_2SO_4 で乾燥後濃縮。残渣を MeOH から再結晶し mp 227~228°C の無色針状晶 (83) (収量, 46 mg) を得た。

Anal. Calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_7$: C, 67.69 ; H, 5.09 ; N, 5.45

Found : C, 67.48 ; H, 5.08 ; N, 5.34

MS m/z : 514 (M^+)

UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm (log ϵ) : 222 (4.76), 285 (4.21), 290 (4.23), 305 (sh, 4.16)

IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3400, 1728, 1670

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 2.15, 2.45 (each s, OCOCH_3), 3.17, 3.54, 4.03 (each s, OCH_3)

6.80~8.20 (9H, m, aromatic H), 7.28 (1H, s, CH), 11.28 (1H, s, NH)

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 21.2 (q), 23.4 (q), 59.7 (q), 60.1 (q), 61.1 (q), 91.0 (s), 98.9 (d), 106.2 (s), 111.3 (d), 115.7 (d), 117.9 (s), 118.7 (d), 119.8 (d), 120.9 (d), 124.4 (d), 125.1 (s), 125.2 (d), 126.6 (s), 128.9 (s), 130.0 (d), 135.7 (s), 137.5 (s), 142.5 (s), 144.5 (s), 145.7 (s), 146.6 (s), 169.1 (s), 169.4 (s)

$[\alpha]_{\text{D}}^{19} + 10.0^\circ$ ($c=0.2$, dioxane)

代謝産物Ⅵ (77) の脱水

77 (300 mg) をベンゼン (40 ml) にとかし p -toluensulfonic acid (100 mg) を加え 75°C で 10 分間加温。反応液を 10% NaHCO_3 と水で洗浄後 Na_2SO_4 で乾燥。溶媒を留去し得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ベンゼン : AcOEt (9 : 1 v/v)) で精製。さらに MeOH より再結晶し mp 272~274°C の無色プリズム晶 (84) (収量, 180 mg) を得た。

Anal. Calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4$: C, 72.80 ; H, 4.89 ; N, 6.79

Found : C, 73.04 ; H, 4.86 ; N, 6.55

MS m/z : 412 (M^+)

UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm (log ϵ) : 235 (4.75), 280 (4.41), 304 (4.54)

IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3340, 1625

$^1\text{H-NMR}$ (acetone- d_6) δ : 3.53, 3.76, 4.16 (each s, OCH_3), 6.85~7.90 (9H, m, aromatic H), 10.41, 11.19 (each s, NH)

代謝産物Ⅶ (78) の性質

淡黄色微細結晶 (ベンゼン), mp 131~140°C

Anal. Calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_5 \cdot \frac{1}{2} \text{C}_6\text{H}_6$: C, 71.21 ; H, 5.05 ; N, 6.15

Found : C, 71.25 ; H, 5.11 ; N, 5.86

MS m/z : 416 (M^+)

UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ nm ($\log \epsilon$): 221 (4.77), 281 (4.13), 289 (4.13), 310 (sh, 4.02)

IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3380, 1610

$^1\text{H-NMR}$ (acetone- d_6) δ : 3.47, 4.00 (each s, OCH_3), 5.15 (1H, s, OH), 6.07 (1H, d, $J=3.6$ Hz, CH), 6.26 (1H, d, $J=3.6$ Hz, NH), 6.50 (1H, s, phenolic OH), 6.50 ~ 7.70 (9H, m, aromatic H), 10.13 (1H, s, NH)

$[\alpha]_{\text{D}}^{21} + 51.2^\circ$ ($c=0.13$, dioxane)

代謝産物Ⅶ (78) のメチル化

78 (50mg) を少量の MeOH にとかし過剰の CH_2N_2 の Et_2O 溶液を加え一夜放置。溶媒を留去し残渣を preparative TLC (シリカゲル, ベンゼン : AcOEt (2 : 1 v/v)) で精製, さらに CCl_4 から再結晶しメチル化体 (=代謝産物Ⅶ (77)) (収量, 23mg) を得た。

$[\alpha]_{\text{D}}^{19} + 29.8^\circ$ ($c=0.1$, EtOH)

代謝産物Ⅶ (78) の LiAlH_4 還元

78 (50mg) を THF (5ml) にとかし LiAlH_4 (100mg) を加え 30 分間加熱還流。反応液を水に注ぎ, HCl 酸性とした後 AcOEt 抽出。 AcOEt 層を水洗し Na_2SO_4 で乾燥後濃縮。残渣をさらにアセトンで抽出する。アセトン可溶部は濃縮後, 残渣をアセトンから再結晶し暗紫色プリズム状の AQ-D (14) (収量, 23mg) を得た。アセトン不溶部 (4mg) は AQ-D キノール体 (85) と TLC における R_f 値および IR, NMR スペクトルが一致した。

代謝産物Ⅷ (79) の性質

無色針状晶 (MeOH), mp 221 ~ 222°C

Anal. Calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4$: C, 63.99; H, 4.92; N, 6.22

Found: C, 64.27; H, 4.92; N, 6.31

MS m/z : 432 (M^+)

UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ nm ($\log \epsilon$): 214 (4.70), 237 (sh, 4.42), 305 (3.96), 320 (sh, 3.87)

IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3380, 1610

$^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$: Table 8 参照

$[\alpha]_{\text{D}}^{19} + 39^\circ$ ($c=0.11$, dioxane)

代謝産物Ⅷ (79) の LiAlH_4 還元

79 (40mg) を代謝産物Ⅶ (78) の場合と同様に LiAlH_4 還元し AQ-D (14) (収量, 16mg) と AQ-D キノール体 (85) (収量, 2mg) を得た。

代謝産物Ⅸ (80) の性質

無色針状晶 (MeOH), mp 141~143°C

Anal. Calcd for $C_{24}H_{23}N_3O_7$: C, 61.93; H, 4.98; N, 9.03

Found: C, 62.07; H, 4.95; N, 9.07

MS m/z : 465 (M^+), 433, 327, 241, 224, 106, 99

IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3250, 2830, 1710, 1675, 1635

UV λ_{\max}^{EtOH} nm (log ϵ): 216 (4.67), 246 (sh, 4.37), 260 (sh, 4.34), 306 (4.11)

1H -NMR (acetone- d_6) δ : 3.75, 3.89, 3.92, 3.94 (each s, OCH_3), 7.28 (1H, ddd, $J=7.8, 7.5, 1.5$ Hz), 7.33 (1H, s), 7.53 (1H, ddd, $J=8, 5, 1$ Hz), 7.64 (1H, ddd, $J=8.3, 7.5, 1.5$ Hz), 8.14 (1H, dd, $J=7.8, 1.5$ Hz), 8.25 (1H, ddd, $J=8, 2.5, 1.5$ Hz), 8.75 (1H, dd, $J=5, 1.5$ Hz), 8.85 (1H, dd, $J=8.3, 1.5$ Hz), 9.17 (1H, dd, $J=2.5, 1$ Hz), 9.55, 12.40 (each s, NH)

代謝産物Ⅸ (80) の脱メチル化

80 (100 mg) を 1N NaOH (5 ml) に懸濁し約 80°C で 80 がとけるまで加温した。反応液を HCl 酸性とし、生ずる沈殿を濾取。これを MeOH から再結晶し mp 227~228°C の無色プリズム晶 (86) (収量, 88 mg) を得た。

Anal. Calcd for $C_{23}H_{21}N_3O_7$: C, 61.19; H, 4.69; N, 9.31

Found: C, 60.96; H, 4.59; N, 9.30

MS m/z : 451 (M^+)

IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3425, 3350, 3300, 2900, 3000~2800 (COOH), 1670, 1650

代謝産物Ⅸ (80) の加水分解

80 (500 mg) に 1N NaOH (20 ml) を加え 100°C で 1 時間加熱後、反応液を HCl 酸性とし AcOEt 抽出。AcOEt 層を水洗し Na_2SO_4 で乾燥後濃縮し、残渣をベンゼンから再結晶し mp 178~180°C の無色プリズム晶 (87) (収量, 200 mg) を得た。

Anal. Calcd for $C_{17}H_{18}N_2O_6$: C, 58.95; H, 5.24; N, 8.06

Found: C, 59.13; H, 5.05; N, 8.10

MS m/z : 346 (M^+), 227, 210, 120

IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3425, 3350, 3300, 2900, 3000~2700 (COOH), 1667, 1650

1H -NMR (DMSO- d_6) δ : 3.77, 3.83, 3.93 (each s, OCH_3), 6.67 (1H, dd, $J=7.5, 7.5$ Hz), 6.71 (1H, d, $J=8$ Hz), 6.75 (1H, bs, NH), 7.18 (1H, s), 7.27 (1H, ddd, $J=8, 7.5, 1.5$ Hz), 7.67 (1H, dd, $J=7.5, 1.5$ Hz), 7.83 (3H, bs, NH_2 and OH)

反応液を AcOEt 抽出した後の水層部は減圧乾固し残渣を EtOH 抽出する。溶媒を留去し残渣を

EtOHから再結晶し mp 270~272°C, 無色針状のニコチン酸のHCl 塩を得た。

Anal. Calcd for $C_6H_5NO_2 \cdot HCl$: C, 45.14; H, 3.76; N, 8.78

Found: C, 44.72; H, 3.63; N, 8.70

化合物(87)の加水分解

87 (100 mg) を 10% NaOH (16 ml) にとかし N_2 気流中で 100°C, 4 時間加熱。反応液を pH 4.5 に調整して AcOEt 抽出する。溶媒を留去し残渣をリグロインで再抽出し, 溶媒を留去して残渣を preparative TLC (シリカゲル, ベンゼン: AcOEt (2:1 v/v)) に付した。Rf 0.45 の部分をベンゼンから再結晶し無色針状の anthranilic acid (22) を得た。また Rf 0.30 の部分をベンゼンと石油ベンジンの混合溶媒から再結晶し mp 141~142°C の無色板状晶 (88) を得た。

Anal. Calcd for $C_{10}H_{13}NO_5$: C, 52.86; H, 5.77; N, 6.17

Found: C, 53.17; H, 5.76; N, 5.88

MS m/z : 227 (M^+)

UV λ_{\max}^{EtOH} nm ($\log \epsilon$): 223 (4.69), 250 (4.23), 349 (4.00)

IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3480, 3380, 2550, 1668

1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 3.90 (s, 3OCH₃), 7.10 (1H, s), 7.83 (3H, bs, NH₂ and OH)

3,4,5-Trimethoxyanthranilic acid の合成

W. Mayer らの方法²⁰⁾に従い行った。

Gallic acid を $(CH_3)_2SO_4$ でメチル化後けん化して trimethyl ether 体を得た。これを Br₂ で処理して得た 1-bromo-3,4,5-trimethoxybenzoic acid をアンモニア水にとかし, これに銅粉末を加え加熱しながらアンモニアガスおよび水素ガスを通じた。生成物をベンゼンと石油ベンジンの混合溶媒から再結晶し mp 141~142°C, 無色板状の 3,4,5-trimethoxyanthranilic acid (収率, 57%) を得た。

代謝産物Ⅸ (80) の合成には, 本化合物を CH_2N_2 でメチル化して得た 3,4,5-trimethoxyanthranilic acid methylester (89) を出発物質として用いた。

化合物(90)の合成

o-Nitrobenzoyl chloride (1.9 g) を $CHCl_3$ (20 ml) にとかし 3,4,5-trimethoxyanthranilic acid methylester (89) (2.45 g) を加え, 約 60°C で 1.5 時間加温。反応途中生成する HCl を中和するため数滴の pyridine を加えた。反応液を 10% HCl, 10% $NaHCO_3$ および水で洗浄, Na_2SO_4 で乾燥後濃縮する。残渣を石油エーテルで洗浄し未反応の anthranilic acid 誘導体を除いてから MeOH を用いて再結晶し mp 148.5~150°C の淡黄色針状晶 (90) (収率, 82%) を得た。

Anal. Calcd for $C_{18}H_{18}N_2O_8$: C, 55.38; H, 4.65; N, 7.18

Found : C, 55.36 ; H, 4.54 ; N, 7.34

MS m/z : 390 (M^+)

化合物 (90) の H_2 / Pd-C 還元

90 (6 g) を MeOH (250 ml) にとかし 10% Pd-C (500 mg) 存在下水素気流中で振盪。触媒を濾去し母液を濃縮乾固する。残渣を MeOH から再結晶し mp 139~141°C の無色針状晶 (91) (収率, 74%) を得た。

Anal. Calcd for $C_{18}H_{20}N_2O_6$: C, 59.99 ; H, 5.97 ; N, 7.77

Found : C, 60.05 ; H, 5.59 ; N, 7.49

MS m/z : 360 (M^+)

代謝産物Ⅸ (80) の合成

Nicotinic acid (200 mg) を $SOCl_2$ で処理して得た nicotinyll chloride を pyridine (0.26 ml) にとかし, 91 (1.08 g/30 ml $CHCl_3$) を加え約 60°C で 30 分間加温。反応液を 10% HCl, 10% $NaHCO_3$ および水で洗浄, Na_2SO_4 で乾燥後濃縮。残渣を Et_2O で洗浄し未反応物を除去後 MeOH から再結晶し mp 141~143°C, 無色針状の代謝産物Ⅸ (80) (収率, 65%) を得た。

§ 第 2 節に関する実験

A. terreus IFO 6123 の培養

前培養のための培地として glucose, 30 g ; $NaNO_3$, 3.0 g ; K_2HPO_4 , 1.0 g ; KCl, 0.5 g ; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5 g ; polypeptone, 3.0 g を蒸留水 1 l にとかしたものをを用いた。これを坂口フラスコに 100 ml ずつ分注し高圧滅菌後 A. terreus IFO 6123 を植菌, 27°C で 2 日間振盪培養 (120 回/分) した。そして得られた菌体を本培養のための培地 (前記培地に $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (1.5 g) を添加したもの) に植え継ぎ, さらに 5 日間振盪培養した後, 菌体を濾取し温風乾燥した。

代謝産物の単離

乾燥菌体 (49 g/7 l 培地) をよく粉碎した後, ソックスレー抽出器を用い, 石油エーテル, $CHCl_3$ で順次抽出した。石油エーテル抽出部から ergosterol および油状の脂質を得た。 $CHCl_3$ 抽出部は減圧濃縮後残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (silicic acid CC-7, Mallinkrodt) に付し, ベンゼンと AcOEt の混合溶媒 (20 : 1 v/v) で展開。溶出する暗赤色の部分をあつめ濃縮し残渣を n-ヘキサンと $CHCl_3$ の混合溶媒から再結晶し mp 188~189°C (dec.), 暗赤色微細針状の astechrome (92) (収量, 330 mg) を得た。

Anal. Calcd for $C_{60}H_{66}FeN_9O_9$: C, 64.74 ; H, 5.98 ; N, 11.33 ; Fe, 5.02

Found : C, 64.61 ; H, 5.96 ; N, 11.05 ; Fe, 5.56 (*o*-phenanthroline による比色定量), 5.36 (原子吸光度法), 5.15 (灰化重量法)

FD-MS m/z : 1113 (13.7%), 1112 (16.3%), 1111 (24.5%)

UV λ_{\max}^{EtOH} nm (log ϵ) : 223 (5.18), 282 (4.39), 292 (4.34), 347 (4.42), 450 (3.68)

IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3420, 1470, 1405

上記のクロマトグラフィーでさらにAcOEt濃度を10%, 次いで15%と段階的に高めて溶出した。第1の分画の濃縮残渣を希MeOHから再結晶しmp 257~259°C, 黄色プリズム状の aspulvinone D(**94**)を得た。また第2の分画の濃縮残渣をMeOHから再結晶しmp 262~264°C, 黄色プリズムの aspulvinone F(**95**)を得た。

Aspulvinone D (**94**)

Anal. Calcd for $C_{27}H_{28}O_6$: C, 72.30 ; H, 6.29

Found : C, 72.15 ; H, 6.31

IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 1720

Aspulvinone F (**95**)

Anal. Calcd for $C_{27}H_{28}O_7$: C, 69.81 ; H, 6.08

Found : C, 69.45 ; H, 6.14

IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 1751, 1600

鉄イオンを添加しない培養からの3,4-Dihydro-6,8-dihydroxy-3-methylisocoumarin (**93**)の単離

鉄を添加しない培地で本培養を行い, 得られた菌体を温風乾燥後 $CHCl_3$ 抽出。溶媒を留去, 残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ベンゼン : AcOEt (8:1 v/v)) で精製, 溶出物をさらに $CHCl_3$ から再結晶しmp 214~215°C, 無色針状の **93**を得た。

Astechrome (**92**) の H_2 /Pd-C還元

92 (100mg) をAcOEt (30 ml) にとかし10% Pd-C (50 mg) 存在下水素気流中で1時間振盪。触媒を汙別し汙液を減圧濃縮。残渣を*n*-ヘキサンと $CHCl_3$ の混合溶媒から再結晶しmp 222~223°Cの暗赤色微細針状晶(**96**) (収量, 70mg)を得た。

Anal. Calcd for $C_{60}H_{72}FeN_9O_9$: C, 64.39 ; H, 6.49 ; N, 11.26

Found : C, 64.05 ; H, 6.52 ; N, 11.49

UV λ_{\max}^{EtOH} nm (log ϵ) : 223 (5.14), 282 (4.41), 292 (4.31), 347 (4.42), 450 (3.68)

IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3420, 1470

Astechrome (92) の H_2/PtO_2 還元

92 (300 mg) を AcOEt (100 ml) にとかし PtO_2 (150 mg) および活性炭 (100 mg) 存在下,*¹ IR ランプで約 60°C に加温しながら水素気流中で 2 時間振盪。触媒を汙別し汙液を減圧濃縮。残渣を *n*-ヘキサンと $CHCl_3$ の混合溶媒から再結晶し mp 141~142°C の無色針状晶 (97) (収量, 210 mg) を得た。

Anal. Calcd for $C_{20}H_{25}N_3O_2$: C, 70.77; H, 7.43; N, 12.38

Found: C, 70.84; H, 7.52; N, 12.52

MS m/z : 339 (M^+), 268

UV λ_{max}^{MeOH} nm (log ϵ): 223 (4.63), 272 (sh, 3.82), 283 (3.85), 293 (3.81), 325 (3.90), 365 (3.67)

UV $\lambda_{max}^{MeOH+OH^-}$ nm: 272, 283, 293, 347

IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3480, 3350, 1650, 1612, 1510, 1460

1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 0.95 (6H, d, $J=6$ Hz, 2 CH_3), 1.55 (3H, m, CH and CH_2), 2.37 (3H, s, CH_3), 2.72 (2H, t, $J=7$ Hz, CH_2), 3.95 (3H, s, OCH_3), 4.07 (2H, s, CH_2), 6.92~7.07 (2H, m, 5 and 6-H of indole), 7.10 (1H, d, $J=2.5$ Hz, 2-H of indole), 7.55 (1H, dd, $J=6, 3$ Hz, 4-H of indole), 7.81 (1H, d, $J=2.5$ Hz, NH)

化合物 (97) の H_2O_2 酸化

97 (300 mg) を EtOH (7 ml) にとかし 0.2 N NaOH (9 ml) と 30% H_2O_2 (9 ml) を加え室温で 4 時間放置。EtOH を減圧留去した後、反応液を HCl 酸性とし AcOEt 抽出。AcOEt 層をさらに 10% $NaHCO_3$ で抽出し、この酸性分画から 3-(3-methylbutyl)anthranilic acid (27) (収量, 7 mg) を得た。

化合物 (97) のアセチル化

97 (120 mg) を pyridine (5 ml) にとかし Ac_2O (10 ml) を加え室温で 6 時間放置。反応液を水に注ぎ、生ずる沈澱を汉取。これを MeOH より再結晶し mp 149~151°C の無色針状晶 (98) (収量, 100 mg) を得た。

Anal. Calcd for $C_{22}H_{27}N_3O_3$: C, 69.27; H, 7.13; N, 11.02

Found: C, 69.28; H, 7.00; N, 10.80

MS m/z : 381 (M^+)

UV λ_{max}^{MeOH} nm (log ϵ): 223 (4.51), 292 (4.09)

IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3370, 1750

*¹ 活性炭を添加しない場合の 97 の反応収率は低かった。反応途中遊離する鉄イオンを活性炭が吸着し、その結果還元が進み易くなったものと考えられる。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.95 (6H, d, $J=6\text{ Hz}$, 2 CH_3), 1.57 (3H, m, CH and CH_2), 2.28 and 2.30 (each 3H, s, OCOCH_3), 2.72 (2H, t, $J=7\text{ Hz}$, CH_2), 3.93 (3H, s, OCH_3), 4.17 (2H, s, CH_2), 6.90~7.10 (3H, m, 2, 5 and 6-H of indole), 7.55 (1H, dd, $J=7$, 2.5 Hz, 4-H of indole), 7.90 (1H, bs, NH)

化合物 (97) の箱守法によるメチル化

97 (50 mg) を N_2 気流中 DMSO (20 ml) にとかした溶液に methylsulfinylcarbonion (2.3 当量, NaH と DMSO から調製) を加え, 室温で 4 時間攪拌した後, CH_3I (1.5 ml) を加えさらに 20 分間攪拌を継続した。反応液を水に注ぎ CHCl_3 抽出し, Na_2SO_4 で乾燥後濃縮し残渣を preparative TLC (シリカゲル, ベンゼン) で精製した。最終的には MeOH から再結晶し mp 70~71°C の無色板状晶 (99) (収量, 20 mg) を得た。

Anal. Calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_2$: C, 71.90 ; H, 7.95 ; N, 11.44

Found : C, 71.82 ; H, 7.78 ; N, 11.53

MS m/z : 367 (M^+), 352, 310

UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm : 227, 303, 323

IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 2950, 1470, 1360, 1260

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.95 (6H, d, $J=6\text{ Hz}$, 2 CH_3), 1.55 (3H, m, CH and CH_2), 2.30 (3H, s, OCH_3), 2.98 (2H, t, $J=7\text{ Hz}$, CH_2), 3.90 (6H, s, 2 OCH_3), 3.92 (3H, s, NCH_3), 4.05 (2H, s, CH_2), 6.77 (1H, s, 2-H of indole), 6.80~7.10 (2H, m, 5 and 6-H of indole), 7.65 (1H, dd, $J=6.5$, 2.5 Hz, 4-H of indole)

化合物 (97) の CH_2N_2 によるメチル化

97 (67 mg) を少量の MeOH に溶解し, これに過剰の CH_2N_2 の Et_2O 溶液を加え一夜放置。減圧濃縮後残渣を preparative TLC (シリカゲル, CHCl_3 : AcOEt (9 : 1 v/v)) で精製し油状物質 (105) を得た。

MS m/z : 353 (M^+)

UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm : 224, 283, 293, 322

IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3400, 1460, 1435, 1370

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.95 (6H, d, $J=7\text{ Hz}$, 2 CH_3), 1.58 (3H, m, CH and CH_2), 2.30 (3H, s, CH_3), 2.73 (2H, t, $J=7.5\text{ Hz}$, CH_2), 3.88 (6H, s, OCH_3), 4.10 (2H, s, CH_2), 6.88~7.20 (3H, m, 2, 5 and 6-H of indole), 7.62 (1H, dd, $J=7$, 3.5 Hz, 4-H of indole), 7.78 (NH)

化合物 (103) も astechrome (92) の場合と同様に PtO_2 触媒を用い接触還元したところ 105 を与えた。

[1-¹⁴C] Alanine および [3-¹⁴C] Tryptophan の投与実験

DL-[1-¹⁴C] Alanine および DL-[3-¹⁴C] tryptophan (各々 50 μ Ci) をそれぞれ滅菌蒸留水 (20 ml) にとかし本培養2日目の培養フラスコ (培地 1 l) に投与した。本培養5日目に菌体を収獲し, astechrome を単離, 精製した。

[1-¹⁴C] Alanine 投与実験では 48mg, また [3-¹⁴C] tryptophan 投与実験では 38mg の radio-active astechrome を得た。

Astechrome (92) の Phosphorous tribromide 処理

92 (350 mg) を AcOEt (100 ml) にとかし氷冷下 PBr₃ (0.4 ml) を加え 2 時間放置。反応液を水洗後, Na₂SO₄ で乾燥。溶媒を留去し残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃:MeOH (20:1 v/v)) で精製。さらに MeOH から再結晶し mp 167~169°C の無色針状晶 (100) (収量, 67 mg) を得た。

Anal. Calcd for C₂₀H₂₃N₃O₂ : C, 71.19 ; H, 6.87 ; N, 12.45

Found : C, 70.88 ; H, 6.94 ; N, 12.32

MS *m/z* : 337 (M⁺), 332, 282, 198

UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ) : 223 (4.46), 282 (3.83), 292 (3.84), 327 (3.91), 365 (3.68)

IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹ : 3420, 1640, 1615, 1520

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 1.70 (6H, s, 2CH₃), 2.32 (3H, s, CH₃), 3.43 (2H, d, *J*=7 Hz, CH₂), 3.91 (3H, s, OCH₃), 4.02 (2H, s, CH₂), 5.25 (1H, t, *J*=7 Hz, CH), 6.80 ~ 7.10 (3H, m, 2,5 and 6-H of indole), 7.50 (1H, dd, *J*=6.5, 3 Hz, 4-H of indole), 7.85 (1H, NH)

化合物 (100) の H₂/Pd-C 還元

100 (50 mg) を AcOEt にとかし 10% Pd-C 存在下水素気流中で 1 時間振盪。触媒を濾去し濾液を濃縮して得た残渣を *n*-ヘキサンと CHCl₃ の混合溶媒から再結晶し mp 141~142°C の無色針状晶 (97) (収量, 45 mg) を得た。

Astechrome (92) の脱鉄

92 (100 mg) をアセトン (20 ml) にとかし攪拌しながら 0.2 N NaOH を滴下する。生じた褐色沈澱物を濾去し濾液のアセトンを減圧留去後残った水層部を HCl 酸性とし生じた沈澱物を濾取, 水洗後デシケーター中で乾燥し無色粉末状の脱鉄体 (101) (収量, 85 mg) を得た。

高分解能-MS *m/z* : 353.174 (Calcd for C₂₀H₂₃N₃O₃ : 353.174)

UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm : 225, 265, 279 (sh), 291, 347 (sh), 364

IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹ : 3400, 1620, 1530, 1485, 1460

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.94 (6H, d, $J=6\text{ Hz}$, 2 CH_3), 1.59 (3H, m, CH and CH_2), 2.44 (3H, s, CH_3), 2.74 (2H, t, $J=7\text{ Hz}$, CH_2), 3.93 (3H, s, OCH_3), 4.28 (2H, s, CH_2), 6.90~7.15 (3H, m, 2,5 and 6-H of indole), 7.59 (1H, dd, $J=7.5, 3.5\text{ Hz}$, 4-H of indole), 7.90 (1H, bs, NH)

化合物(101)からAstechrome (92)の復生

101 (15 mg) を Et_2O (20 ml) にとかし, 1% FeCl_3 水溶液 (10 ml) とともに振盪。 Et_2O 層を水洗後, Na_2SO_4 で乾燥。溶媒留去後, 残渣を n -ヘキサンと CHCl_3 の混合溶媒から再結晶し暗赤色微細針状晶を得た。本品は astechrome (92) の標品との混融試験ならびに IR スペクトルの比較により同定された。

化合物(101)の銅錯体

101 (50 mg) を Et_2O (50 ml) にとかし 12.5% $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 水溶液とともに振盪。 Et_2O 層を水洗後, Na_2SO_4 で乾燥。溶媒留去後, 残渣をアセトンから再結晶し mp 162°C の緑色微細針状晶 (102) を得た。

Anal. Calcd for $(\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_3)_2\text{Cu}$: C, 62.52 ; H, 5.77 ; N, 10.94

Found : C, 62.38 ; H, 5.69 ; N, 11.02

MS m/z : 767 (M^+)

UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ) : 223 (5.64), 283 (4.91), 292 (4.54), 355 (5.28), 640

IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3420, 1470, 1405, 1200

化合物(101)の H_2 /PtO₂接触還元

101 (50 mg) を astechrome (92) の場合と同様に PtO_2 存在下水素気流中で接触還元し mp $141\sim 142^\circ\text{C}$, 無色針状の 97 (収量, 32 mg) を得た。

化合物(101)のTrimethylphosphite 処理

101 (90 mg) を trimethylphosphite (9.5 ml) にとかし約 100°C で 2.5 時間加熱。反応液を水に注ぎ AcOEt 抽出し, AcOEt 層を水洗後 Na_2SO_4 で乾燥。溶媒を留去し残渣を preparative TLC (シリカゲル, CHCl_3 : MeOH (5 : 1 v/v)) で精製, さらに MeOH から再結晶し mp $167\sim 169^\circ\text{C}$, 無色針状の 100 (収量, 10 mg) を得た。

化合物(101)のメチル化

101 (21 mg) に過剰の CH_3N_2 の Et_2O 溶液を加え 15 分間放置。 Et_2O を留去後, 残渣を preparative TLC (シリカゲル, CHCl_3 : AcOEt (2 : 1 v/v)) で精製し, さらに石油エーテルと Et_2O の

混合溶媒から再結晶し mp 129~130°C の無色針状晶 (**103**) (収量, 6 mg) を得た。

Anal. Calcd for $C_{21}H_{25}N_3O_3$: C, 68.64; H, 6.86; N, 11.44

Found: C, 68.34; H, 6.87; N, 11.23

MS m/z : 367 (M^+), 350, 292, 198

UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 225 (4.86), 265 (4.26), 292 (4.00), 325 (4.08)

IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3340, 2840, 1600, 1470, 1430, 1230, 1212

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.67 (6H, s, 2 CH_3), 2.33 (3H, s, CH_3), 3.46 (2H, d, $J=8\text{ Hz}$, CH_2), 3.92 (3H, s, OCH_3), 3.98 (3H, s, OCH_3), 4.30 (2H, s, CH_2), 5.24 (1H, t, $J=8\text{ Hz}$, CH), 6.80~7.00 (2H, m, 5 and 6-H of indole), 7.32 (1H, d, $J=3\text{ Hz}$, 2-H of indole), 7.67 (1H, m, 4-H of indole), 7.90 (NH)

化合物 (**103**) の H_2 / Pd-C 還元

103 (42 mg) を AcOEt にとかし 10% Pd-C (100 mg) 存在下, IR ランプで約 60°C に加温し水素気流中 1 時間振盪。触媒を濾去し濾液を濃縮, 残渣を n -ヘキサンから再結晶し mp 139~141°C の無色微細針状晶 (**104**) (収量, 21 mg) を得た。

Anal. Calcd for $C_{21}H_{27}N_3O_3$: C, 68.27; H, 7.37; N, 11.37

Found: C, 68.62; H, 7.57; N, 11.46

UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ nm (log ϵ): 220 (4.85), 264 (4.26), 291 (4.01), 322 (4.08)

IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3300, 2850, 1600, 1475, 1435

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.94 (6H, d, $J=7\text{ Hz}$, 2 CH_3), 1.57 (3H, m, CH and CH_2), 2.33 (3H, s, CH_3), 2.75 (2H, t, $J=8\text{ Hz}$, CH_2), 3.94 (3H, s, OCH_3), 3.96 (3H, s, OCH_3), 4.29 (2H, s, CH_2), 6.85~7.02 (2H, m, 5 and 6-H of indole), 7.30 (1H, d, $J=3\text{ Hz}$, 2-H of indole), 7.63 (1H, dd, $J=8, 3.5\text{ Hz}$, 4-H of indole), 7.96 (1H, NH)

化合物 (**97**) の EtOH 中の H_2 / PtO_2 還元

97 (100 mg) を EtOH (30 mL) にとかし PtO_2 (30 mg) 存在下水素気流中 3 時間振盪。触媒を濾去し濾液を減圧濃縮。残渣を preparative TLC (シリカゲル, CHCl_3 : アセトン (1:1 v/v)) に付した。R_f 0.75 の部分を石油エーテルから再結晶し mp 148°C の無色針状晶 (**106**) (収量, 40 mg) を得た。

Anal. Calcd for $C_{20}H_{27}N_3O_2$: C, 70.35; H, 7.97; N, 12.31

Found: C, 70.21; H, 8.03; N, 12.17

MS m/z : 341 (M^+), 201, 143

UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 223 (4.59), 283 (3.84), 292 (3.76)

IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3540, 3330, 1700, 1650, 1435

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$: 0.97 (6H, d, $J=6.5\text{ Hz}$, 2 CH_3), 1.03 (3H, d, $J=7.5\text{ Hz}$, CH_3), 1.60 (3H, m, CH and CH_2), 2.80 (2H, t, $J=7.5\text{ Hz}$, CH_2), 3.19 (2H, AB part of ABX type, $J=14, 7.5\text{ Hz}$, CH_2), 3.80 (3H, s, OCH_3), 4.03 (1H, qd, $J=7.5, 2.5\text{ Hz}$, CH), 4.26 (1H, ddd, $J=7.5, 4, 2.5\text{ Hz}$, CH), 6.53 (bs, NH), 6.95~7.10 (3H, 2, 5 and 6-H of indole), 7.40 (1H, dd, $J=7.3\text{ Hz}$, 4-H of indole), 8.34 (1H, NH)

また TLC の R_f 0.8 の部分を石油エーテルから再結晶して mp 141°C の無色針状晶 (収量, 7mg) を得た。本物質は **106** の立体異性体と考えられた。

化合物 (**106**) の脱メチル化

106 (50 mg) を氷酢酸 (20 ml) にとかし 10% HCl (1 ml) を加え 10 分間加熱還流。反応液を 10% NaHCO_3 で中和し AcOEt 抽出する。AcOEt 層を Na_2SO_4 で乾燥後、溶媒を留去し残渣を preparative TLC (シリカゲル, AcOEt) で精製。さらに MeOH から再結晶し mp $235\sim 237^\circ\text{C}$ の無色微細結晶 (**107**) (収量, 24 mg) を得た。

Anal. Calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_2$: C, 69.70; H, 7.70; N, 12.84

Found: C, 69.70; H, 7.64; N, 13.04

UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 222 (4.60), 275 (3.84), 282 (3.85), 292 (3.76)

IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 1677, 1670

$^1\text{H-NMR}(\text{AcOH}-d_4) \delta$: 0.44 (3H, d, $J=7\text{ Hz}$, CH_3), 0.94 (6H, d, $J=6\text{ Hz}$, 2 CH_3), 1.57 (3H, m, CH and CH_2), 2.84 (2H, t, $J=7\text{ Hz}$, CH_2), 3.35 (2H, AB part of ABX type, $J=14.5, 4.4\text{ Hz}$, CH_2), 3.94 (1H, qd, $J=7, 1.5\text{ Hz}$, CH), 4.49 (1H, dd, $J=4.4, 1.5\text{ Hz}$, CH), 6.68~6.92 (2H, m, 5 and 6-H of indole), 7.11 (1H, s, 2-H of indole), 7.41 (1H, dd, $J=6, 3.5\text{ Hz}$, 4-H of indole)

107 を 6N-HCl とともに 130°C で 2 時間加熱後、反応液をそのままアミノ酸分析計で分析した。

化合物 (**97**) の AcOH 中 H_2/PtO_2 還元

97 (190 mg) を氷酢酸 (30 ml) にとかし PtO_2 (30 mg) 存在下、IR ランプで約 60°C に加温しながら水素気流中 5 時間振盪。触媒を濾取し濾液を減圧濃縮し、残渣を preparative TLC (シリカゲル, CHCl_3 : アセトン (2:1 v/v)) に付した。 R_f 0.2 の部分を n -ヘキサンと CHCl_3 の混合溶媒から再結晶し mp 149°C の無色針状晶 (**108**) (収量, 70 mg) を得た。

Anal. Calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}$: C, 72.80; H, 8.68; N, 13.41

Found: C, 72.85; H, 8.80; N, 13.21

MS m/z : 313 (M^+), 201, 200

UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 282 (3.84), 292 (3.75)

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$: 0.95 (6H, $J=6\text{ Hz}$, 2 CH_3), 1.37 (3H, d, $J=7\text{ Hz}$, CH_3), 1.65

(3H, m, CH and CH₂), 2.81 (2H, t, $J=7$ Hz, CH₂), 2.98 (2H, AB part of ABX type, $J=10, 6, 3.5$ Hz, CH₂), 3.08 (2H, AB part of ABX type, $J=13, 5, 3$ Hz, CH₂), 3.52 (1H, q, $J=7$ Hz, CH), 3.68 (1H, m, CH), 5.84 (1H, NH), 7.00~7.15 (3H, m, 2, 5 and 6-H of indole), 7.04 (1H, dd, $J=6.5, 3$ Hz, 4-H of indole), 8.36 (1H, NH)

第3章 に関する実験

§ 第1節 に関する実験

A. terreus IFO 4100 の培養

培養液として glucose, 20 g ; malt extract, 20 g ; polypeptone, 1 g を水道水 1 l にとかしたものの(麦芽エキス培地)を用いた。これを 200 ml ずつ Roux flask に分注し高圧滅菌後, *A. terreus* IFO 4100 を植菌, 27℃で3週間静置培養した。

代謝産物の抽出, 単離

i) 第1法

培養液を菌体と分け, 約1/10量に減圧濃縮後AcOEt抽出した。AcOEt抽出部はさらに10% NaHCO₃で抽出, NaHCO₃層をHCl酸性とし再びAcOEtで抽出した。抽出液を濃縮後, 残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, ベンゼンとAcOEtの混合溶媒を用い, AcOEt濃度を5%から30%に段階的に上げ展開した。第1分画の濃縮残渣をベンゼンより再結晶しmp 127~130℃, 無色板状の terreic acid を得た。また第2分画の濃縮残渣をベンゼンより再結晶しmp 173~175℃, 無色微細結晶状の orsellinic acid を得た。次に第3分画の濃縮残渣をEt₂Oより再結晶しmp 171~173℃, 無色針状の itaconic acid を得た。さらに第4分画の濃縮残渣をAcOEtより再結晶しmp 146~148℃(dec.), 無色微細針状の teremutin を得た。最後に第5分画の濃縮残渣をベンゼンより再結晶しmp 177~180℃, 橙色板状の 3,6-dihydroxytoluquinone を得た。

ii) 第2法

培養液を1/10量に濃縮後, Et₂OおよびAcOEtで抽出した。

Et₂O抽出部は濃縮後残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ベンゼン: AcOEt)で分離した。10% AcOEt濃度で溶出する分画の濃縮残渣をCH₂Cl₂から再結晶し butyrolactone-I (2) (収量, 150 mg/1 l 培地)を得た。また20% AcOEt濃度で溶出する分画の濃縮残渣をCH₂Cl₂から再結晶し butyrolactone-II (110) (収量, 90 mg/1 l 培地)を得た。30% AcOEt濃度で溶出する分画には butyrolactone-III (111) と代謝産物(112)が含まれていた。この分画を preparative TLC (シリカゲル, ベンゼン: AcOEt (10: 3 v/v)) で分離し, butyrolactone-III (111) (収量,

150mg/1l 培地)と代謝産物(112)(収量, 4mg/1l 培地)をそれぞれ純粋に得た。さらに35% AcOEt 濃度で溶出する分画からは(3R)-3,4'-dihydroxy-6,8-dihydroxy-3-methyisocoumarin (93)を得た。

代謝産物(112)の性質

Et₂Oより再結晶しmp 190~192°Cの無色針状晶として得た。

Anal. Calcd for C₁₂H₁₄O₆: C, 56.69; H, 5.55

Found: C, 56.62; H, 5.67

MS *m/z*: 254 (M⁺)

UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ nm (log ϵ): 219 (4.38), 228 (sh), 273 (4.12), 307 (3.63)

IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹ 3480, 1648

¹H-NMR (acetone-*d*₆) δ : 1.49 (3H, d, *J*=6.5 Hz, CH₃), 3.76 (3H, s, OCH₃), 3.94 (3H, s, OCH₃), 4.62 (1H, d, *J*=2 Hz, C₄-H), 4.70 (1H, bs, alcoholic OH), 4.73 (1H, qd, *J*=6.5, 2 Hz, C₃-H), 6.75 (1H, s, C₅-H), 11.24 (1H, s, phenolic OH)

CD (*c*=0.04, EtOH) $\Delta\epsilon^{18}$: -1.42 (273)

一方AcOEt抽出液を減圧濃縮してゆくと結晶が析出した。これをろ取りベンゼンから再結晶しmp 133~134°C, 無色針状のastepyrone (109)(収量, 50~100mg/1l 培地)を得た。ろ液をさらに濃縮したところ terrein (収量, 200mg/1l 培地)が析出した。これをろ取り, ろ液は乾固し残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ベンゼン: AcOEt (9:1 v/v))に付した。R_f 0.75のスポットを示す画分を合せ濃縮し残渣を*n*-ヘキサンから再結晶しmp 154~156°C, 無色針状の代謝産物(113)(収量, 10mg/1l 培地)を得た。

Astepyrone (109)の性質

Anal. Calcd for C₉H₁₂O₅: C, 53.99; H, 6.04

Found: C, 54.07; H, 6.06

MS *m/z*: 200 (M⁺)

UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ nm (log ϵ): 235 (4.06)

IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3334, 2884, 1675, 1663, 1630

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ : 3.74, 3.76 (s, OCH₃), 5.11, 5.18 (s, C₃-H), 6.70 (bs, OH)

その他はFig. 9参照

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ : 11.9, 15.1 (q, 9-CH₃), 42.0, 44.9 (d, C-7), 44.9, 46.4 (d, C-5), 56.5, 56.7 (q, 10-CH₃), 88.5, 88.8 (d, C-3), 100.1, 101.0, 101.3 and 105.9 (each d, C-6 and C-8), 163.3 (s, C-2), 172.4, 172.9 (s, C-4)

$[\alpha]_{\text{D}}^{14} + 80.7^\circ$ (*c*=0.9, pyridine)

CD (*c*=0.03, EtOH) $\Delta\epsilon^{20}$: +19.6° (247)

代謝産物(113)の性質

Anal. Calcd for $C_{10}H_{16}O_5$: C, 55.54 ; H, 7.46

Found : C, 55.35 ; H, 7.68

MS m/z : 216 (M^+), 185, 127, 114

UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ nm ($\log \epsilon$) : 233 (4.06)

IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : ca. 3000~2500 (COOH), 1680, 1600

$^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$: Table 9 参照

$[\alpha]_D^{29} + 79^\circ$ ($c=0.45$, EtOH)

Astepyron (109) の *p*-Nitrobenzoate

109 (100 mg) と *p*-nitrobenzoyl chloride (140 mg) を pyridine (2 ml) にとかし水浴上 (約 80°C) で 15 分間加温後, 反応液を水に注ぎ Et_2O 抽出する。 Et_2O 層を 10% HCl, 次いで水で洗浄。 Na_2SO_4 で乾燥後濃縮し, 残渣を Et_2O から再結晶し mp 160°C (dec.) の淡黄色プリズム晶(114)(収量, 79 mg)を得た。

Anal. Calcd for $C_{16}H_{15}\text{NO}_8$: C, 55.01 ; H, 4.33 ; N, 4.01

Found : C, 55.03 ; H, 4.27 ; N, 3.87

MS m/z : 349 (M^+)

$[\alpha]_D^{18} + 65^\circ$ ($c=0.4$, EtOH)

Astepyron (109) の CrO_3 酸化

109 (100 mg) を氷酢酸 (2 ml) にとかし CrO_3 (130 mg) を氷酢酸 (2 ml) にとかしたものを加え室温で 1 時間放置。過剰の CrO_3 を MeOH で分解後, 反応液を水に注ぎ AcOEt 抽出する。 AcOEt 層を水洗後 Na_2SO_4 で乾燥。溶媒留去し得られる残渣を isopropyl ether から再結晶し mp $98\sim 99^\circ\text{C}$ の無色針状晶(115)(収量, 95 mg)を得た。

Anal. Calcd for $C_9H_{10}O_5$: C, 54.54 ; H, 5.09

Found : C, 54.61 ; H, 5.06

MS m/z : 198 (M^+)

UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ nm ($\log \epsilon$) : 234 (4.09)

IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 1804, 1726, 1636

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 1.26 (3H, d, $J=6.9\text{ Hz}$, CH_3), 3.00 (1H, dt, $J=10, 6.9\text{ Hz}$, $\text{C}_7\text{-H}$), 3.23 (1H, dd, $J=10, 5.6\text{ Hz}$, $\text{C}_5\text{-H}$), 3.79 (3H, s, OCH_3), 5.33 (1H, s, $\text{C}_3\text{-H}$), 6.38 (1H, d, $J=5.6\text{ Hz}$, $\text{C}_6\text{-H}$)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 14.7 (q, C-9), 38.6 (d, C-7), 44.3 (d, C-5), 56.8 (q, C-10), 89.3 (d, C-3), 97.0 (d, C-6), 161.7 (s, C-2), 170.4 (s, C-4), 175.2 (s, C-8)

$[\alpha]_D^{27} + 89^\circ$ ($c=0.7$, EtOH)

CD ($c=0.02$, EtOH) $\Delta\epsilon^{20}$: -12.6 (226), $+21.0$ (247)

Astepyron (109) の Ethanedithiol 処理

109 (200 mg) に氷冷下 ethanedithiol (4 ml) と BF_3 -etherate (2 ml) を加えた後、 4°C で一夜放置。反応液に水を加え CHCl_3 抽出し、 CHCl_3 層を Na_2SO_4 で乾燥後溶媒留去。残渣を preparative TLC (シリカゲル, ベンゼン : AcOEt (3 : 1 v/v)) で精製。さらに CCl_4 から再結晶し mp $157 \sim 159^\circ\text{C}$ の無色プリズム晶 (**118**) (収量, 165 mg) を得た。

Anal. Calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_3\text{S}_4$: C, 44.29; H, 5.72

Found: C, 44.13; H, 5.63

MS m/z : 352 (M^+), 190, 132

UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm (log ϵ): 238 (4.01)

IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : ca. 3100~2600 (COOH), 1668, 1590

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.12 (3H, d, $J=6.8\text{ Hz}$, CH_3), 2.46 (1H, m, $-\text{CH}-\text{CH}_3$), 3.13, 3.23 (each 4H, bs, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 3.68 (3H, s, OCH_3), 4.39 (1H, dd, $J=11, 4.2\text{ Hz}$, CH), 4.68 (1H, d, $J=5.2\text{ Hz}$, CH), 4.73 (1H, d, $J=11\text{ Hz}$, CH), 5.18 (1H, s, CH)

$[\alpha]_D^{18} - 61^\circ$ ($c=1.1$, EtOH)

化合物 (118) の Raney-Ni による脱硫

118 (165 mg) を EtOH (50 ml) にとかし W_2 -Raney-Ni (10 g のニッケル合金から調製した) とともに4時間加熱還流。触媒を濾取し EtOH で洗浄した。反応生成物は触媒に吸着されていたので、触媒を10% HCl に溶解後 CHCl_3 抽出した。 CHCl_3 層は水洗後 Na_2SO_4 で乾燥し、溶媒を留去して得られた残渣を preparative TLC (シリカゲル, ベンゼン : AcOEt (4 : 1 v/v)) で精製し淡黄色油状物質 (**119**) (収量, 45 mg) を得た。

Anal. Calcd for $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{O}_3$: C, 62.04; H, 10.41

Found: C, 61.92; H, 10.69

MS m/z : 175. 1336 (calcd for $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{O}_3$ ($\text{M}^+ + 1$), 175. 1333), 159 ($\text{M}^+ - \text{CH}_3$), 142 ($\text{M}^+ - \text{OCH}_3$), 115 ($\text{M}^+ - \text{CH}_2\text{COOH}$), 103 ($\text{CH}(\text{OCH}_3)\text{CH}_2\text{COOH}$), 70 ($\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$), 43 (CH_3CHCH_3)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.77~0.98 (9H, 3 CH_3), 1.61 (2H, m, 2CH), 2.48 (2H, m, CH_2), 3.36 and 3.38 (OCH_3), 3.69 (1H, m, CH), 10.17 (1H, bs, OH)

NMR でメトキシ基のシグナルが2個に分かれて現われていることより **119** は2個のジアステレオマーの混合物 (7 : 5) であることが示唆された。

$[\alpha]_D^{29} + 39^\circ$ ($c=0.8$, EtOH)

Astepyrone (109) のアンモニア処理

109 (200mg) を 30% NH_4OH (8ml) にとかし室温で 20 分間放置。反応液を HCl 酸性とし Et_2O 抽出。 Et_2O 層を水洗後、 Na_2SO_4 で乾燥し、溶媒を留去し得られる残渣をリグロインから再結晶し mp 117~119°C、無色プリズム状の 3-acetyl-4-methylpyrrole (**116**) (収量, 29mg) を得た。

Anal. Calcd for $\text{C}_7\text{H}_9\text{NO}$: C, 68.27; H, 7.37; N, 11.37

Found: C, 68.24; H, 7.34; N, 11.26

MS m/z : 123 (M^+), 108, 80

UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm (log ϵ): 249 (3.92), 280 (sh)

IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3200, 1625

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 2.32 (3H, d, $J=1\text{Hz}$, CH_3), 2.40 (3H, s, $-\text{COCH}_3$), 6.55 (1H, m, C_2-H), 7.35 (1H, dd, $J=3.5, 2\text{Hz}$, C_5-H), 8.59 (1H, bs, NH)

化合物 (116) の Semicarbazone

116 (66mg) を EtOH にとかし semicarbazine $\cdot \text{HCl}$ (96mg) および NaOAc (74mg) を加えて 2 時間加熱還流。反応液を AcOEt 抽出し水洗後 Na_2SO_4 で乾燥する。溶媒を留去して得られる残渣を MeOH から再結晶し mp 193~195°C の淡黄色針状晶 (**117**) (収量, 31mg) を得た。

Anal. Calcd for $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}$: C, 53.32; H, 6.71; N, 31.09

Found: C, 53.32; H, 6.54; N, 30.81

MS m/z : 180 (M^+)

IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3490, 3420, 3200, 1683

Astepyrone (109) の 2,4-Dinitrophenylhydrazone

109 (100mg) を EtOH にとかし 2,4-dinitrophenylhydrazine 硫酸試薬 (2,4-DNP, 0.4g; c H_2SO_4 , 2ml; EtOH , 10ml; H_2O , 3ml) (6ml) を加え室温で 5 時間放置。生成する赤色沈澱を濾取、 MeOH と THF の混合溶媒から再結晶し mp 295~296°C の赤橙色プリズム晶 (**120**) (収量, 106mg) を得た。

Anal. Calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_8\text{O}_8$: C, 47.11; H, 3.33; N, 23.13

Found: C, 47.34; H, 3.35; N, 22.86

MS m/z : 484 (M^+)

IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3450, 1615

代謝産物 (112) の脱水

112 (10mg) を氷酢酸 (1ml) にとかし I_2 (5mg) と赤リン (5mg) を加え 2 時間加熱還流。反応液を冷却後不溶物を濾去し濾液を減圧乾固。残渣を Et_2O から再結晶し mp 195~197°C の無色針状晶

(収量, 6mg)を得た。本物質は 6,7-dimethoxy-8-hydroxy-3-methylisocoumarin と融点および IR, NMR スペクトルの比較により同定された。

Anal. Calcd for $C_{12}H_{12}O_5$: C, 61.01; H, 5.12

Found: C, 60.98; H, 5.19

MS m/z : 236 (M^+)

IR $\nu_{\max}^{KBr} \text{ cm}^{-1}$: 1672, 1587

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 2.21 (3H, s), 3.85, 3.88 (each s, OCH_3), 6.07 (1H, bs), 6.20 (1H, s), 11.17 (1H, s, OH)

上記の脱水体 (5mg) を pyridine (1ml) にとかし Ac_2O (1ml) を加え一夜放置した後, 常法に従って処理。反応産物を MeOH から再結晶し mp 184~186°C, 無色針状のアセチル化体 (収量, 3mg) を得た。本物質は 6,7-dimethoxy-8-acetyl-3-methylisocoumarin と融点および IR, NMR スペクトルの比較により同定された。

IR $\nu_{\max}^{KBr} \text{ cm}^{-1}$: 1760, 1720, 1665, 1605

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 2.18 (3H, s), 2.42 (3H, s), 3.78, 3.88 (3H, each s), 6.00 (1H, s), 6.50 (1H, s)

§ 第2節に関する実験

[2- ^{14}C] Sodium acetate の投与実験

A. terreus IFO 4100 を Fernbach flask (麦芽エキス培地, 800ml) に培養し, 培養開始5日目の菌蓋の下に [2- ^{14}C] sodium acetate (1.08×10^8 dpm) を滅菌蒸留水 (5ml) にとかし投与した。 ^{14}C 化合物投与後, 培養中発生する CO_2 を 10% NaOH に捕集した。培養開始後3週間目にかびを収獲, 代謝産物を第1節で記述した方法で単離, 精製し母液等については逆稀釈法で代謝産物の量および放射能を求めた。

[1- ^{13}C] Sodium acetate の投与実験

A. terreus IFO 4100 を Roux flask (麦芽エキス培地, 1l) に培養し, 培養開始後5日, 7日, 9日目に [1- ^{13}C] sodium acetate (500mg, 90% isotopic purity) を滅菌蒸留水 (18ml) にとかしたものを菌蓋の下に分注した。培養開始後2週間目にかびを収獲し astepyrone (109) を単離, 精製した。収量, 14mg

[Aldehyde- ^{14}C] Orsellinaldehyde の合成

Orcinol (1.3g) を Et_2O (15ml) にとかし [^{14}C] NaCN (250 μCi) と $\text{Zn}(\text{CN})_2$ (1.8g) を加

え、乾燥HCl ガスを通じながら室温で2時間攪拌。この間に針状の結晶が析出した。Et₂O層を傾斜法により除去し、残った結晶に水(10 ml)を加え、数分間加熱沸騰させた。反応液を冷却し生成する沈澱を濾取。水より再結晶し mp 187~189°C, 無色針状の [¹⁴C] orsellinaldehyde (収量, 1.02 g ; 比放射活性, 4.1×10^4 dpm/mg) を得た。

[Carboxyl-¹⁴C] Orsellinic acid の合成

上記の [¹⁴C] orsellinaldehyde (800 mg) をアセトン (3.5 ml) にとかし ethyl chloro-carbonate (1.1 ml) を加え、これに氷冷下 1N NaOH (5.3 ml) を滴下し 40 分間攪拌した。さらに室温にもどし 4 時間放置し、生成した沈澱を濾取。石油ベンジンから再結晶し mp 60~61°C, 無色プリズム状の bis (ethoxycarbonyl) 誘導体 (収量, 1.07 g) を得た。

この bis (ethoxycarbonyl) 誘導体 (1.07 g) をアセトン (9.5 ml) にとかし KMnO₄ 水溶液 (0.94 g を 16 ml の水にとかし) を滴下し約 40°C で 45 分間放置する。生成する沈澱を濾別し濾液を H₂SO₄ 酸性にすると mp 117~119°C, 無色針状の bis (ethoxycarbonyl) orsellinic acid (収量, 940 mg) が得られた。

この粗 bis (ethoxycarbonyl) orsellinic acid (760 mg) を 1N NaOH (12.6 ml) にとかし室温で 1.5 時間放置後、反応液を HCl 酸性とし、生ずる沈澱を濾取。AcOEt とベンゼンの混合溶媒から再結晶し mp 186~189°C, 無色針状の [¹⁴C] orsellinic acid (収量, 270 mg ; 比放射活性, 3.8×10^4 dpm/mg) を得た。

2-o-[¹⁴C] Methylorsellinic acid の合成

Ethyl-4-ethoxycarbonylorsellinate (270 mg) をアセトン (5 ml) にとかし [¹⁴C] CH₃I (100 μ Ci, 0.1 ml) と K₂CO₃ (140 mg) を加え 6 時間加熱還流。不溶物を濾別し濾液を濃縮乾固。残渣を preparative TLC (シリカゲル, ベンゼン : AcOEt (30 : 1 v/v)) で精製し無色油状の ethyl-2-methoxy-4-ethoxycarbonylorsellinate (収量, 210 mg) を得た。

これに c H₂SO₄ (0.55 ml) を加え室温で 5 時間放置後、反応液を水に注ぎ Et₂O 抽出。Et₂O 層を水洗し Na₂SO₄ で乾燥後濃縮。残渣を石油ベンジンと AcOEt の混合溶媒から再結晶し mp 100~104°C, 無色針状晶の 2-methoxy-4-ethoxycarbonylorsellinic acid (収量, 90 mg) を得た。

これを 4N NaOH (1.4 ml) にとかし室温で 2 時間放置後、反応液を HCl 酸性として生ずる沈澱を濾取。n-ヘキサンと AcOEt の混合溶媒から再結晶し mp 175~177°C, 無色微細結晶状の 2-o-[¹⁴C]-methylorsellinic acid (収量, 39 mg ; 比放射活性, 4.26×10^5 dpm/mg) を得た。

¹⁴C 標識芳香族化合物の投与実験

[¹⁴C] Sodium acetate の投与実験の場合と同様に行った。

[Aldehyde-¹⁴C] Orsellinaldehyde の水溶液を各々培養開始後 5 日目, 10 日目および 15 日

目の菌蓋の下に投与した。培養開始後3週間目のかびを収獲，astepyrone (109) を単離，精製しその放射活性を測定した。

[Carboxyl- ^{14}C]Orsellinic acid および 2-o- ^{14}C methylorsellinic acid も上記と同様の方法で菌に投与し astepyrone (109) を単離，精製後放射活性を測定した。

引 用 文 献

- 1) 山本譲, 宮田賞受賞記念報文集“カビの代謝物の化学ならびに生合成”(1972)
- 2) Y. Yamamoto, K. Nishimura, and N. Kiriya, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **24**, 1853 (1976). Y. Yamamoto, N. Kiriya, S. Shimizu, and S. Koshimura, *Gann*, **67**, 623 (1976)
- 3) N. Kiriya, K. Nitta, Y. Sakaguchi, Y. Taguchi, and Y. Yamamoto, *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 2593 (1977)
- 4) N. Sakabe, T. Goto, and Y. Hirata, *Tetrahedron Lett.*, **1964**, 1825
- 5) W. A. Jerram, A. G. McInnes, W. S. G. Maass, D. S. Smith, A. Taylor, and J. A. Walter, *Can. J. Chem.*, **53**, 927 (1975)
- 6) R. J. Wikholm and H. W. Moore, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 6152 (1972) and Ref. 5
- 7) M. Akagi, *Yakugaku Zasshi*, **62**, 129 (1942)
- 8) E. Schwenner, Dissertation, University Münster (1982)
- 9) cf. M. Barbeta, G. Casnati, A. Pochini, and A. Selva, *Tetrahedron Lett.*, **1969**, 4457; H. Nagasawa, A. Isogai, A. Suzuki, and S. Tamura, *Tetrahedron Lett.*, **1976**, 1601
- 10) 標品は名城大学井上昭二教授より分与された。
- 11) S. Sekita, K. Yoshihira, S. Natori, S. Udawagawa, T. Muroi, Y. Sugiyama, H. Kurata, and M. Umeda, *Can. J. Microbiol.*, **27**, 766 (1981); S. Sekita, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 2998 (1983)
- 12) M. A. O'Leary, and J. R. Hanson, *Tetrahedron Lett.*, **1982**, 1885
- 13) S. Shimizu, Y. Yamamoto, J. Inagaki, and S. Koshimura, *Gann*, **73**, 643 (1982); S. Shimizu, Y. Yamamoto, and S. Koshimura, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 1896 (1982)
- 14) M. Fujino, T. Kamiya, H. Iwasaki, J. Ueyanagi, and A. Miyake, *Chem. Pharm. Bull.*, **12**, 1390 (1964)
- 15) G. Casnati, R. Marchelli, and A. Pochini, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1974**, 754
- 16) S. Inada, K. Nagai, Y. Takayangi, and M. Okazaki, *Bull. Chem. Soc., Jpn*, **49**, 833 (1976)
- 17) R. McGrath, and P. N. Nourse, *Bioorganic. Chem.*, **6**, 53 (1977)

- 18) C. M. Allen, *Biochemistry*, **11**, 2154 (1972)
- 19) A. W. Sangester and K. L. Stuart, *Chem. Rev.*, **65**, 69 (1965)
- 20) W. Mayer and R. Fikentscher, *Chem. Ber.*, **89**, 511 (1956)
- 21) N. Ojima, S. Takenaka, and S. Seto, *Phytochemistry*, **14**, 573 (1975)
- 22) cf. ferriburin; W. Keller-Schierlein, *Helv. Chim. Acta*, **46**, 1920 (1963); coprogen: *ibid, idem*, **53**, 2035 (1970)
- 23) S. Hakomori, *J. Biochem.*, (Tokyo), **55**, 205 (1964)
- 24) H. Shindo, *Chem. Pharm. Bull.*, **7**, 472 (1959)
- 25) T. Emery and J. B. Neilands, *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 3658 (1960)
- 26) T. Emery, *Biochemistry*, **4**, 1410 (1965)
- 27) W. B. Turner and D. C. Aldridge ed, "Fungal Metabolites II" Academic Press (1983)
- 28) 秋山雅安, 有機合成化学, **40**, 1189 (1982)
- 29) R. H. Hill, R. H. Carter, and J. Statunton, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1981**, 3570
- 30) R. Hänsel, H. Rimpler, and L. Langhamer, *Z. Anal. Chem.*, **218**, 346 (1966)
- 31) H. Fischer, E. Sturm, and H. Friedrich, *Anal. Chem.*, **461**, 256 (1972). P. Pfäffi and Ch. Tamm, *Helv. Chim. Acta*, **52**, 1911 (1969); *ibid, idem*, **52**, 1921 (1969)
- 32) H. Lichtenwald, *Z. Physiol. Chem.*, **273**, 1251 (1942)
- 33) J. Lin, S. Yoshida, and N. Takahashi, *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 363 (1971)
- 34) R. D. Hutchinson and P. S. Steyn, *Tetrahedron Lett.*, **1971**, 4033
- 35) H. Arakawa, *Bull. Chem. Soc., Jpn.*, **41**, 2541 (1968) and Ref. 13
- 36) A. Pelter and M. T. Ayoub, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1981**, 1173
- 37) R. Thomas, *Biochem. J.*, **78**, 748 (1961)
- 38) L. Zamir, in P. S. Steyn ed, "The Biosynthesis of Mycotoxins" P.233, Academic Press (1980)
- 39) E. C. Wagner, J. K. Simons, *J. Chem. Educ.*, **13**, 265 (1936)
- 40) A. A. Kandutch, H. Paulus, E. Levin, K. Bloch, *J. Biol. Chem.*, **239**, 2507 (1964)